

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologie

Bc. Pavel Pešek



Genetická diverzita raka kamenáče v okrajových částech areálu
Genetic diversity of stone crayfish *Austropotamobius torrentium*
in marginal areas of its distribution

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Adam Petrusek PhD.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 08. 2013

.....

Poděkování:**Děkuji všem, kdo přispěli ke vzniku této práce**

V první řadě chci poděkovat svému školiteli Adamovi Petruskovi za spoustu užitečných rad a nápadů při metodickém zpracování práce a při vyhodnocování výsledků a také za výjimečnou pečlivost, se kterou četl a komentoval jednotlivé verze tohoto vznikajícího textu.

Také chci poděkovat všem, kdo se podíleli na sběru vzorků v rámci monitoringu výskytu raků v ČR, ze kterého pochází většina vzorků a dalších sběrů v rámci ČR. Vděk také cítím vůči zahraničním kolegům, kteří pro mou práci poskytli nebo se podíleli na sběru referenčních vzorků mimo Českou Republiku. Konkrétně jde o Peer Martina, Christofa Chucholla a Eduarda Stloukala za pomoc při získání referenčních sekvencí pocházejících mimo českou oblast povodí Labe.

Dále patří mé velké díky Danu Leštinovi, který zpracoval vzorky použité pro pilotní studii genetické studie raka kamenáče, které tvoří podstatný podíl souboru sekvencí zahrnutý v této práci.

Za ochotnou pomoc s nesčetnými drobnými problémy při práci v laboratoři a diskuze o vhodných úpravách protokolů postupů děkuji vedoucí laboratoře katedry ekologie Jasně Vukičové, jakož i starším studentům katedry ekologie.

Abstrakt

Střední Evropa na sever od Alp byla kolonizována jednou z balkánských haplotypových linií raka kamenáče *Austropotamobius torrentium* po konci poslední doby ledové. V povodí Dunaje a Rýna je rak kamenáč považován za původní druh. Původ populací v povodí Labe je stále diskutován, řada recentních evropských prací zabývajících se rozšířením raků udává raka kamenáče v povodí Labe jako nepůvodní druh.

Hlavním cílem mé práce bylo zhodnotit otázku původu raka kamenáče v povodí Labe pomocí popisu rozložení genetické variability, která dosud nebyla v povodí Labe u raka kamenáče studována. K tomuto účelu byl použit 617 párů bází dlouhý úsek mitochondriálního genu malé podjednotky I cytochrom c oxidázy. Variabilita tohoto markeru je u populací na sever od Alp snižena, což souhlasí s předpokladem rychlé kolonizace po skončení poslední doby ledové. Nalezená haplotypová diverzita je nicméně dostatečná pro zodpovězení dané otázky. Mezi 22 populacemi z povodí Labe byl nalezen jeden dominantní a tři vzácné haplotypy. Jedinci z izolovaného Lučního potoka v Podkrkonoší mají haplotyp, který byl dosud nalezen jen ve středním Slovinsku, a tato populace je pravděpodobně introdukovaná. Krom toho byly nalezeny dva vzácné haplotypy z nichž jeden se vyskytuje kromě povodí Labe také v jižním Německu a druhý je pro povodí Labe unikátní. Počet a rozložení vzácných haplotypů v povodí Labe je velmi podobný jako v částech povodí Dunaje a Rýna na sever od Alp, což podporuje předpoklad přirozeného původu většiny populací raka kamenáče v povodí Labe. Nejpravděpodobnějším scénářem osídlení povodí Labe je překonání rozvodí Labe a Dunaje v Českém lese a následná kolonizace povodí Labe stejnou kolonizační vlnou, která osídlila celou část areálu na sever od Alp.

Z důvodu zjištěné malé variability studovaného úseku genu COI jsem se v druhé části své práce pokusil zvýšit rozlišení dat, která by ale zároveň měla být srovnatelná se staršími údaji. Proto jsem se pokusil nalézt protokol umožňující amplifikovat a osekvenovat výrazně delší úsek studovaného genu (COI). Kombinace primerů použité pro tento gen v jiných pracích zaměřených na raky se nicméně neukázaly jako vhodné, amplifikovaly jaderné pseudogeny mitochondriálního genu COI. Pro budoucí práce studující genetickou diverzitu raka severní části areálu raka kamenáče by měly být použity variabilnější markery, například mikrosatelity.

Klíčová slova: *Austropotamobius torrentium*, COI, haplotyp, genetická diverzita, pseudogen, povodí Labe.

Abstract

Central Europe north of the Alps was colonized by one of the Balkan haplotype lineage of stone crayfish *Austropotamobius torrentium* after the end of the last ice age. Stone crayfish is considered a native species in the basins of the Danube and the Rhine. The origin of populations from the Elbe basin is still debated. Most of recent European studies dealing with the crayfish distribution indicate the stone crayfish in Elbe basin as non-indigenous species.

The main aim of my work was to evaluate the question of the origin of stone crayfish in the Elbe catchment by describing the distribution of genetic variability, which has not been yet studied in the Elbe river basin for this species. I have used 617 base pairs long section of mitochondrial gene for small subunit I of cytochrome c oxidase (COI). The variability of this marker is reduced in area on the north of Alps, which agrees with assumption of rapid colonization after the end of last ice age. Observed haplotype diversity is nevertheless sufficient to suggest the most likely scenario. Among 22 populations from Elbe basin, one dominant and three rare haplotypes were found. Individuals from the isolated Luční creek close to the Krkonoše (Giant Mountains) region have a haplotype that has so far been found only in central Slovenia, and this population has most likely been introduced by humans. Of the two rare haplotypes, one occurs also in southern Germany and the other is unique for the Elbe basin. Number and distribution of rare haplotypes in the Elbe basin is very similar as in parts of the Danube and Rhine north of Alps, which supports the assumption of the natural origin of most stone crayfish populations in the Elbe basin. The most likely scenario of colonization of Elbe basin is overcoming the water divide of the Elbe and Danube in the northern part of the Bohemian Forest, and subsequent colonization of the Elbe basin by the same colonization wave that colonized the whole area north of the Alps.

In the second part of my thesis, I attempted to increase resolution of the dataset, while retaining a direct comparability with previous data. Therefore, I tried to optimize a protocol that would allow amplification and sequencing of a substantially extended section of the COI gene. Primers that have been used in other studies in case of stone crayfish apparently anneal to the sequence of different gene, which is the reason why I obtained only COI-like sequences. They are most likely nuclear pseudogenes of the mitochondrial COI gene and they are thus unusable for my study. Future studies of stone crayfish genetic diversity in the north of Alps should use more variable markers, such as microsatellites.

Key words: *Austropotamobius torrentium*, COI, haplotype diversity, pseudogene, Elbe catchment.

Obsah

1 Úvod.....	7
1.1 Molekulární markery využívané ke studiu genetiky raků.....	9
1.2 Popis studovaného druhu raka kamenáče.....	11
1.2.1 Taxonomické zařazení raka kamenáče.....	11
1.2.2 Areál raka kamenáče.....	12
1.2.3 Ekologie raka kamenáče.....	12
1.2.4 Shrnutí současných znalostí o fylogeografii raka kamenáče.....	17
2 Cíle práce.....	19
3 Metodika.....	20
3.1 Lokality.....	20
3.2 Sběr vzorků.....	21
3.3 Laboratorní zpracování vzorků.....	23
3.4 Zpracování dat a analýzy.....	28
4 Výsledky.....	29
4.1 Genetická diverzita raka kamenáče.....	29
4.1.1 Rozšíření souboru dat o genetické diverzitě raka kamenáče v povodí Labe.....	29
4.1.2 Genetická diverzita raka kamenáče ve střední Evropě.....	31
4.1.3 Genetická diverzita raka kamenáče v kontextu celého areálu.....	32
4.2 Amplifikace a sekvence dlouhého úseku genu COI.....	37
5 Diskuze.....	38
5.1 Genetická diverzita raka kamenáče.....	38
5.1.1 Původ populací raka kamenáče v povodí Labe.....	38
5.1.2 Fylogeografie raka kamenáče: povodí Labe ve vztahu ke zbytku areálu.....	42
5.1.3 Porovnání zjištěných údajů o genetické diverzitě a fylogeografii raka kamenáče s jinými druhy.....	43
5.2 Neúspěšný pokus o sekvenaci dlouhého úseku genu COI.....	46
6 Závěr.....	49
7 Seznam citované literatury.....	50

1 Úvod

Raci jsou největší mobilní sladkovodní bezobratlí. Již dlouhodobě budí zájem lidí, například v Evropě byli již od středověku přenášeni a vysazováni jakožto oblíbený druh jídla (Holdich a kol. 2009a). V Evropě a Severní Americe jsou již dlouho oblíbeným modelovými druhy anatomů a fyziologů a v posledních desetiletích se stávají středem zájmu molekulární biologie. V posledních letech je k nim upřena větší vědecká pozornost z důvodu jejich ohrožení (Holdich 2002a). V Evropě se vyskytuje jen pět až šest původních račích druhů patřících do čeledi *Astacidae* (Holdich a kol. 2009b), což je velmi malý podíl z celkového počtu přibližně 600 račích druhů (Crandall a Buhay 2008). Evropské račí druhy jsou v současnosti ohrožené zejména v důsledku vysazování a šíření nepůvodních račích druhů a změnami habitatů způsobenými lidmi (Holdich a kol. 2009b). Nejnebezpečnější invazní druhy raků pochází ze severní Ameriky (Filipová a kol. 2009). Tito raci jsou přenašeči račího moru, což je choroba smrtelná pro jiné druhy raků (Kozubíková a kol. 2009). Raci jsou často klíčové druhy ekosystémů (Holdich a kol. 2002a) a jejich ztráta nebo nahrazení nepůvodními druhy často vede ke změnám vodních ekosystémů (Gherardi 2010, Strayer 2010).

Pro plánování ochrany račích druhů je nezbytné znát jejich genetickou variabilitu, která odpovídá historii konkrétní skupiny populací a může zahrnovat i specifické adaptace na lokální podmínky prostředí (Bermingham a Moritz 1998). Vhodné metody pro vyhodnocení údajů o genetické diverzitě poskytuje fylogeografie. Fylogeografie je vědní obor, který studuje geografické rozložení genealogických linií a jeho historické příčiny (Avise 2000). Jako ochrannářské jednotky by měly být chápány skupiny populací se společnou historií mající unikátní genetickou variabilitu (Moritz 1994).

Poskytování podkladů pro ochrannářský management je pouze druhotný výstup fylogeografie. Primárním cílem fylogeografie je studium faktorů podílejících se na současném rozložení genetické diverzity na vnitrodruhové úrovni. Srovnání fylogeografie více druhů může vést k pochopení příčin současného rozložení biodiverzity. Příkladem může být studie srovnávající fylogeografii ryb Bernatcheze a Wilsona (1988). Rozšíření genealogických linií souvisí s historickým zvětšováním a zmenšováním areálů a izolací populací. Zvětšování areálu závisí na disperzních schopnostech druhu, které předurčují jak efektivně se dokáže šířit a jaké typy bariér dokáže jeho šíření zastavit. Ekologické nároky druhu pak určují, zda se dokáže na nově osídlené lokalitě udržet. Fylogeografie druhu sama o sobě může naznačovat jeho historii. Například větší genetická variabilita může znamenat dlouhodobou přítomnost druhu a dobré propojení populací. Oproti tomu výskyt skupiny více divergentních linií v jedné oblasti může znamenat dlouhodobý výskyt v nespojitém areálu. Malá variabilita může

odpovídat nedávné kolonizaci nebo výraznému poklesu početnosti lokálních populací nebo vysazení lidmi. Ke správné interpretaci rozložení genetické diverzity je zapotřebí porovnání s historickými daty o vývoji oblasti, například paleoklimatologickými nebo orografickými (Bermingham a Moritz 1998).

Fylogeografie sladkovodních živočichů jako jsou raci, je specifická tím, že vodní prostředí je přirozeně fragmentované a že existují přirozené bariéry šíření a zároveň jasné migrační koridory v rámci povodí. U sladkovodních živočichů, kteří nejsou běžně schopní překonávat bariéru souše oddělující povodí lze předpokládat, že jejich fylogeografie bude odpovídat historickým změnám v propojenosti a obyvatelnosti vodních habitatů (například Siegmund a Muller 1991, Zaccara a kol. 2005).

K výrazným změnám v obyvatelnosti a propojenosti povodí došlo na severní polokouli v průběhu pleistocénních dob ledových. V průběhu posledních 700 tisíc se zintenzivnila série zalednění z nichž každé trvalo zhruba 100000 let, a které byly odděleny kratšími teplejšími obdobími interglaciálů. S těmito cykly klimatických změn souvisel periodický ústup většiny druhů do refugií v chladných obdobích a rychlá rekolonizace severních částí Evropy v obdobích interglaciálů. Tradičními refugiálními oblastmi, kde druhy přežívali období zalednění se v Evropě nalézají na jižních poloostrovech, s čímž u mnoha druhů souvisí vyšší genetická variabilita na jihu Evropy. Důsledkem rychlé rekolonizace po skončení poslední doby ledové je snížení genetické variability na sever od Alp. Důsledkem přežívání ledových dob v různých refugiích je také vznik vnitrodruhových linií, které se znovu setkaly až po poslední době ledové. Linie různých druhů, které přežili chladná období ve společných refugiích se mohly šířit společnými kolonizačními cestami. Vliv ledových dob často ztěžuje odhalení příčin rozdělení starších linií (obvykle druhových) například v průběhu klimatických a orografických změn v Evropě v průběhu třetihor (Hewitt 1996, Taberlet a kol. 1998).

K vysvětlení fylogeografie celé řady evropských taxonů bylo třeba pátrat i po jiných než klasických refugiích (Provan a Bennet 2008). O netradičních refugiích u sladkovodních živočichů píše například Verovnik a kol. (2005), Gouin a kol. (2006), Vainio a Väinölä (2003) a Englbrecht a kol. (2000).

Fylogeografické metody jsou také vhodné při řešení otázky původnosti některých druhů v oblastech, kde je nejasné zda jde o druh původní. Ukázkovým příkladem může být série článků diskutujících původ španělských populací raka bělonohého, kdy první studie s malým počtem vzorků došly k závěru, že jde pro tento poloostrov o druh nepůvodní (Grandjean a kol. 2001, Trontelj a kol. 2005), zatímco novější studie genetické variability přesvědčivě potvrdily, že jde o druh původní (Beroiz a kol 2008, Diéguez-Urbeondo a kol. 2008, Pedraza-

Lara a kol. 2010). Ve své práci se snažím zjistit zda lze pomocí studia genetické diverzity potvrdit nebo vyvrátit předpoklad, že je rak kamenáč původním druhem povodí Labe. Povodí Labe představuje izolovaný severozápadní okraj areálu raka kamenáče a většina současných prací (např. Holdich a kol. 2009b) stále opakuje předpoklad Machina a Füredera (2005) a Machina a Holdicha (2006), že je rak kamenáč v povodí Labe nepůvodním druhem.

1.1 Molekulární markery využívané ke studiu genetiky raků

V současnosti existuje velké množství markerů, které lze použít při studiu genetiky raků. Dále však popisují jen zavedené metody, které byly u raků úspěšně použity a některé možné nové metody.

Nejpoužívanějším markerem ve studiu fylogeografie živočichů je mitochondriální DNA (mtDNA). Mitochondriální markery jsou nejpoužívanější na základě obecných vlastností mtDNA. Mitochondriální DNA je přítomná u všech živočichů a je dostatečně konzervativní, aby bylo možné použít stejné metody u různých druhů, současně mutuje dostatečně rychle, aby umožnila studium vnitrodruhové variability. Mitochondriální DNA je u většiny živočichů děděna pouze po matce a každý gen bývá u jednoho jedince přítomen obvykle jen v jedné variantě (Petrusek a kol. 2013). Pro většinu obecných předpokladů o mitochondriální DNA byly nalezeny u různých druhů výjimky a probíhá diskuze o tom na kolik je vhodné tyto markery využívat jako pro studium fylogeografie. Diskuzi o vhodnosti mitochondriální DNA pro molekulární studie shrnuje Galtier a kol. (2009).

Variabilita mtDNA může být zkoumána pomocí délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP). Metoda RFLP spočívá v izolaci mtDNA a následném štěpení pomocí restrikčních enzymů. Počet i délka vznikajících restrikčních fragmentů je specifická pro daného jedince. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí pomocí gelové elektroforézy. Metoda RFLP byla použita například pro popis genetické variability raka bělonohého v anglických populacích (Grandjean a kol. 1997). Tato metoda ovšem není při studiu ohrožených račích druhů zcela vhodná, protože vyžaduje usmrcení jedince.

Dalšími mitochondriálními markery jsou úseky sekvencí mitochondriálních genů. Sekvence částí genů lze získat velmi snadno i z malého množství tkáně a zkoumané jedince není třeba zabíjet. Nejpoužívanějšími mitochondriálními markery u raků jsou mitochondriální geny pro COI, a geny umístěné na malé a velké ribozomální podjednotce (12S a 16S rRNA geny). Z těchto genů je obecně považován za nejvariabilnější gen COI. Ve studii Trontelja a kol. (2005) se gen COI ukázal jako variabilnější a vhodnější pro popis fylogeneze a fylogeografie rodu *Austropotamobius* než gen 16S. Gen COI se také ukázal vhodnějším než

12S rRNA gen při určení druhové příslušnosti raka mramorovaného jako partenogenetické formy raka *Procambarus fallax* (Martin a kol. 2010). Větší variabilitu a informativnost než 12S a 16S rRNA geny měl gen COI i ve studii fylogeneze několika druhů krevet (Baeza a Fuentes 2013). Gen COI se používá i jako hlavní marker barcodingu, což je metoda určení druhu podle krátké sekvence genu (Hebert a kol. 2003). U raků je barcoding užitečný například při určování druhů z čeledi *Cambaridae*, u kterých lze podle morfologických znaků určit do druhu pouze samce v pohlavně aktivní formě (Kozák a kol. 2013). Pomocí sekvence genu COI byla dále popsána například fylogeografie raka říčního (Schrimpf a kol. 2011). 16S gen byl použit například pro fylogeografickou studii raka bělonohého a nový návrh jeho taxonomie (Grandjean a kol. 2002, Fratini a kol. 2005). 12S gen byl použit jako jeden z markerů ve studii hodnotící fylogenezi všech raků (Sinclair a kol. 2004).

Vzhledem ke své mateřské dědičnosti je ale mitochondriální DNA nevhodným markerem pro vyhodnocení genového toku nebo reprodukčních bariér mezi druhy. Mitochondriální DNA je také nevhodná pro výzkum genetické diverzity u populací, které prošly výrazným poklesem početnosti z toho důvodu, že efektivní velikost populace je pro mitochondriální DNA čtvrtinová oproti jaderné DNA. Jaderné markery jsou také vhodnější pro studium genetické variability na vnitropopulační úrovni a zjišťování historie populací.

Jednou z nejstarších metod pracujících s jadernými markery je enzymová elektroforéza, která neziskává přímo genetickou informaci, ale využívá skutečnosti, že variabilita protein kódujících genů se může odrážet v rozdílné struktuře kódovaných proteinů, což se odráží v různé pohyblivosti proteinů v elektrickém poli. Pomocí enzymové elektroforézy byla například zkoumána variabilita skandinávských populací raka říčního (Agerberg 1990), raka bělonohého v západní Evropě (Santucci a kol. 1997) a českých populací invazního raka pruhovaného (Filipová a kol. 2009). Enzymová elektroforéza je nepraktická zejména kvůli způsobu uchování vzorků. Vzorky musí být čerstvé nebo hluboce zmrazené na rozdíl od standardních analýz DNA, u kterých stačí vzorek uchovat v lihu.

Z jaderných genů se u raků používají například geny 18S a 28S, které použil jako jedny z fylogenetických markerů Crandall a kol. (2000) pro vyřešení otázky monofylie raků.

Další metodou používající jaderné markery je metoda RAPD (Random amplified length polymorphism), při této metodě jsou větší množství primerů s velkým množstvím templátové DNA. Při PCR se pak náhodně amplifikují různě dlouhé fragmenty a poměr a počet různých dlouhých fragmentů může vzniknout částečně unikátní profil pro jedince. Tato metoda byla úspěšně použita pro raka bělonohého (například Gouin a kol. 2003).

Obecně platí, že lepší představu o rozložení genealogických linií podávají studie kombinující více markerů. Tyto studie zároveň umožňují lepší vyhodnocení fylogenetických vztahů (například Cataudella a kol. 2010, Trontelj a kol. 2005, Crandall a kol. 2000).

Dalšími variabilními novějšími variabilními markery jsou mikrosatelity. Mikrosatelity jsou nekódující opakuující se sekvence jednoho až několika nukleotidů, jejichž počet opakování velmi snadno mutuje. Fragmenty DNA obsahující mikrosatelity se proto mohou lišit svou délkou, čehož se využívá při jejich hodnocení. Mikrosatelity byly například použity ke studiu genetické variability raka bělonohého v alpské oblasti (Baric a kol. 2006) a ve Francii (Gouin a kol. 2006). Navíc existují navržené mikrosatelity pro raka říčního (Kõiv a kol. 2008) a raka kamenáče (Iorgu a kol. 2011). Dalším vysoce variabilnějším markerem, který pravděpodobně bude u raků brzo použit jsou SNP (single nucleotide polymorphisms). Tato metoda vyhodnocuje bodové mutace pro konkrétní nukleotidy jednoho genu (Petrusek a kol. 2013).

1.2 Popis studovaného druhu raka kamenáče

1.2.1 Taxonomické zařazení raka kamenáče

Konkrétní taxonomické zařazení vlastního druhu raka kamenáče je následující: Podkmen: Crustacea (Brunnich, 1772), Třída: Malacostraca (Latreille, 1802), Podtřída: Eumalacostraca (Grobbe, 1892), Nadřád: Eucarida (Calman, 1904), Řád: Decapoda (Latreille, 1802), Podřád: Pleocyemata (Burkenroad, 1963), Infrařád: Astacidea (Latreille, 1802), Nadčeleď: Astacoidea (Latreille, 1802), Čeleď: *Astacidae* (Latreille, 1802), Rod: *Austropotamobius* (Skorikov 1907), Druh: *torrentium* (Schrank, 1803) (Crandall a kol. 2000).

Recentní objev výrazně se lišících haplotypových linií v oblasti Dinárského krasu (Trontelj a kol. 2005, Klobučar a kol. 2013) povede pravděpodobně ke změnám v taxonomii raka kamenáče a jeho přijetí jako druhového komplexu. Taxonomie je nejasná i u ostatních evropských raků (Holdich 2002b). U sesterského taxonu raka bělonohého probíhá dlouhodobá diskuze o jeho členění na druhy *Austropotamobius pallipes* s. s. a *Austropotamobius italicus* a členění *A. italicus* na poddruhy. U rodu *Astacus* je taxonomie nerozřešená hlavně kvůli nedostatku údajů z východní Evropy. Problematiku taxonomie původních evropských račích druhů rozebírám detailněji ve své bakalářské práci (Pešek a kol. 2011).

Aktuálně lze považovat za nejrozšířenější členění původních evropských raků do pěti až šesti druhů rozdělených do dvou rodů. Rod *Astacus* zahrnuje druhy *A. astacus*, *A. leptodactylus* a *A. pachypus*. Rod *Austropotamobius* zahrnuje dva druhové komplexy: Komplex raka bělonohého, který větší počet autorů člení na druhy *A. pallipes* s. s. a *A. italicus*, ačkoli toto členění je stále předmětem diskuze, a komplex raka kamenáče, který je

zatím považovaný za jeden druh. Celkový počet pěti až šesti druhů raků v Evropě představuje jen velmi malou část z celkového počtu přibližně 600 druhů raků (Crandall a Buhay 2008).

1.2.2 Areál raka kamenáče

Rak kamenáč má nejmenší areál z původních evropských druhů raků (Holdich a kol. 2006). Jeho výskyt je v současnosti potvrzen ve střední a jihovýchodní Evropě. Severní hranice areálu prochází Českem a Německem. Nejsevernější populace byla nalezena v Sasku nedaleko Drážďan (Martin a kol. 2008). Jihovýchodní hranice areálu prochází Rumunskem, Bulharskem, Řeckem a evropskou částí Turecka (Trontelj a kol. 2005), západní hranice prochází Lucemburskem (Holdich a kol. 2009b).

Ve střední Evropě na sever od Alp se rak kamenáč vyskytuje v povodí v povodí Dunaje, Rýna a Labe (Schubart a Huber 2006). Stávající výskyt v povodí Labe je potvrzen minimálně na 46 lokalitách (Štambergová a kol. 2009, Martin a kol. 2008). Rak kamenáč je naším nejvzácnějším původním račím druhem s centrem výskytu ve středních a západních Čechách v povodích řek Úslava, Úhlava, Radbuza, Střela, Klabava, Berounka a Zubřina. Dále se omezeně vyskytuje na území CHKO České Středohoří, v Podkrkonoší (Štambergová a kol. 2009).

1.2.3 Ekologie raka kamenáče

Habitatové nároky raka kamenáče předurčují jaké typy lokalit bude schopen osídlit. Typickým prostředím raka kamenáče jsou malé až středně velké horní toky s kamenitým dnem (Maguire a Gottstein-Matočec 2004, Machino a Füreder 2005, Vlach a kol. 2009). Kamenité dno je pro raka kamenáče i další raky důležité z toho důvodu, že poskytuje úkryty. V malých tocích by byli nechránění raci snadnou kořistí pro norky nebo vydry, kteří jsou v těchto tocích významnými predátory raků (Fischer a kol. 2009). Velká závislost raka kamenáče na úkrytech se projevila i v jeho chování při laboratorních experimentech, kdy rak kamenáč v porovnání s rakem signálním trávil v úkrytech více času a byl agresivnější při jejich obraně (Vorbürger a Ribi 1999).

Kromě oblíbených mezer pod kameny poskytují další úkryty například velké kořeny nebo díry pod břehem, rak kamenáč si také dokáže vyhrabávat nory v jílových březích (Kozák 2002, Machino a Füreder 2005, Pârvulescu 2012). Toky osídlené rakem kamenáčem nejsou obvykle širší než 10 m a nacházejí se až na výjimky v nadmořské výšce do 800 m (Kouba a kol. 2013). V České republice jde o toky se šířkou 40 cm až 8 m v nadmořské výšce 360 – 600 m (Vlach a kol. 2010). Raci kamenáči dobře snáší vyšší rychlost vody, ale vyhýbají se

místům s rychlostí nad 25 cm/s. Rak kamenáč má z evropských račích druhů nejvyhraněnější nároky na teplotu vody (Maguire a Gottstein-Matočec 2004). Za optimální letní teplotu se považuje 14-18 °C, ale při dostatečné saturaci kyslíkem to může být až 20 °C. Okolí toku je obvykle tvořeno smíšenými nebo listnatými lesy nebo doprovodným pásem keřů a vrb, v němž převládají vrby, topoly a jilmy (Kouba a kol. 2013).

Na českých lokalitách raka kamenáče měřili hodnoty různých chemických a fyzikálních faktorů například Svobodová a kol. (2008) a Vlach a kol. (2012). Z těchto prací zahrnuli Vlach a kol. (2012) nejvíce lokalit, na kterých byly jednotlivé hodnoty měřeny opakovaně v průběhu čtyř let. Důležitým faktorem je například biochemická spotřeba kyslíku (množství kyslíku spotřebované při oxidaci veškerých organických látek ve vodě) měřená pomocí hodnoty BSK₅. Tato hodnota odpovídá míře znečištění a s ní souvisejícímu poklesu kyslíku. Vlach a kol. (2012) naměřily hodnoty BSK₅ v rozmezí 1,17 - 4,8 mg/l, což blíží hodnotám naměřeným Svobodovou a kol. (2008). Vlach a kol. (2012) navíc zaznamenali zvýšenou mortalitu raků v případech prudkého nárůstu BSK₅. Souvisejícím faktorem je koncentrace kyslíku, která byla naměřena v rozmezí 7,47-11,9 mg/l (Vlach a kol. 2012), což se podobá výsledkům Svobodové a kol. (2008), kteří navíc zaznamenali změnu chování raka kamenáče při poklesu kyslíku a zvýšení teploty, kdy se raci pohybovali mimo úkryty i přes den, což pravděpodobně souvisí s tím, že v jejich úkrytech bylo snížené množství kyslíku v důsledku biochemických procesů probíhajících v sedimentech dna. S biochemickými procesy ve vodách souvisí i hodnota pH, která se v tocích obývaných rakem kamenáčem pohybuje v hodnotách 6,96 – 8,41 (Vlach a kol. 2012), podobné hodnoty naměřili i Svobodová a kol. (2008). Hodnota pH ovlivňuje i toxicitu dalších látek. Při vyšších hodnotách pH se amoniakální dusík vyskytuje v toxické formě. Koncentrace amonného iontu byla určena jako hlavní limitující faktor výskytu raka kamenáče Vlachem a kol. (2012), kteří naměřili hodnotu mezi 0,0002 – 0,0024 mg/l. Svobodová a kol. (2008) naměřili podobné koncentrace. Koncentrace jednotlivých látek popsané pro české toky obývané rakem kamenáčem se podobají i studiím z jiných částí areálu, například z rumunské části povodí Dunaje (Pârvulescu a kol. 2011).

Svobodová a kol. (2008) i Vlach a kol. (2012) se shodli na výjimečnosti Zákolanského potoka. Tento potok je silně znečištěný komunálními odpadními vodami a byla zde naměřena také velmi nízká koncentrace kyslíku 2,8 Svobodová a kol. (2008) a 1,77 mg/l (Vlach a kol. 2012). V tomto potoce se vyskytovali společně rak kamenáč i rak říční (Svobodová a kol. 2008). Ani rak říční ani rak kamenáč nejsou vhodnými bioindikátory čisté vody (Svobodová a kol. 2008, Štambergová a kol. 2008). Poté co byla populace raka říčního v hlavním toku

Stroupinského potoka částečně vyhubena v důsledku havárie vody rozšířil se tam rak kamenáč z přítoků, což naznačuje, že pro raka kamenáče byl důležitější větší počet úkrytů než znečištění (Svobodová a kol. 2008).

Z našich raků má nejpodobnější nároky na prostředí jako rak kamenáč rak říční (Svobodová a kol. 2008, Štambergová a kol. 2009). Z ostatních evropských raků má velmi podobné nároky rak bělonohý. Od raka kamenáče se odlišuje hlavně menšími nároky na množství kyslíku (Trouilhé a kol. 2007).

Krom tekoucích povrchových vod se rak kamenáč může vyskytovat i v dostatečně čistých vodách stojatých. Příkladem může být jezero Haldensee v Rakousku (Machino a Füreder 1998). Rak kamenáč se navíc může vyskytovat také v podzemních vodách, nejznámějším případem je jeskynní systém Aggitis na severu Řecka, kde byla nalezena populace raka kamenáče hluboko v jeskynním systému (Koutrakis a kol. 2005). Možnost přežívání raka kamenáče v jeskynních je diskutována při zvažování glaciálních refugií (Pârvulescu a kol. v tisku) (viz kapitola 1.2.4).

Důležitou vlastností spolu určující současné rozšíření genealogických linií raka kamenáče jsou disperzní schopnosti. U raků bylo jako adaptace na život v tekoucích vodách potlačeno stadium planktonní larvy a nemají ani jiná specializovaná disperzní stadia umožňující pasivní šíření nebo přežití vyschnutí lokality, které jsou jinak u vodních bezobratlých běžná (Palmer a kol. 1996). Není také známo, že by u nich hrálo významnější roli pasivní šíření se zvířecími vektory, které bylo popsáno u jiných skupin sladkovodních bezobratlých (Frisch a kol. 2007, Vanschoenwinkle a kol. 2008). U více druhů se předpokládá, že jsou schopni se šířit mezi lokalitami s pomocí volavek, příkladem může být rak říční (Aldridge 2011). Nicméně oproti většině jiných sladkovodních živočichů mají raci tu výhodu, že umí chodit po souši. Tato račí schopnost byla detailněji zkoumána například u raka *Procambarus clarkii* (Grote 1981) a u raka *Orconectes rusticus*, u kterého jde o nezbytnou adaptaci vzhledem k tomu, že se často vyskytuje v částečně vysychajících tocích (Claussen a kol. 2000). Je možné předpokládat, že raci obývající horní toky v blízkosti rozvodí by mohli kolonizovat sousední povodí přechodem malého úseku souše (viz kapitola 5.1.1).

Při studiu pohybu ve vodě byla u raka kamenáče zjištěna tendence setrvávat v blízkosti úkrytu (Pöckl a Streissel 2005). Ve 140 dní trvajícím experimentu v přírodních podmínkách zůstala většina raků v blízkosti svého úkrytu a pouze několik jedinců překonalo za 24 hodin vzdálenost 55 metrů přičemž nebyla zaznamenána silnější preference pro migraci po proudu nebo proti proudu (Pöckl a Streissl 2005). Podobné výsledky měla i studie srovnávající pohybovou aktivitu raka kamenáče a rak říčního (Kadlecová a kol. 2012), jejíž výsledky

ukázaly, že rak říční je pohyblivější než rak kamenáč. U obou druhů se prokazatelně nelišila míra pohybu mezi pohlavími. Největší vzdálenost z raků kamenáčů překonala samice, která se ušla po proudu 133 m za 55 dní, zatímco jedna ze samic raka říčního ušla 151 m proti proudu za 33 dní (Kadlecová a kol. 2012). Studie, která použila ke sledování pohybu raka bělonohého vysílačky dospěla k podobným, i když přesnějším údajům o pohybu než jaké byly zjištěny u raka kamenáče. Raci bělonozí se za den přemístili v průměru o 23,3 cm (Bubb a kol. 2008). Ovšem toto nízké číslo odráží i fakt, že studie probíhala celoročně. Malá pohyblivost raka kamenáče pravděpodobně souvisí s jeho velkou závislostí na úkrytech (Vorburger a Ribí 1999).

Vzdálenosti, na které se běžně pohybují rak kamenáč, rak bělonohý a rak říční (Pöckl a Streissl 2005, Bubb a kol. 2008, Kadlecová a kol. 2012) byli podstatně menší než rychlost šíření invazního raka signálního, který se ve dvou anglických řekách šířil rychlostí 2,4 km za rok (přibližně 66 m za den), přičemž převažovalo šíření po proudu (Bubb a kol. 2005).

Výskyt raka kamenáče není ovlivněn jen jeho nároky na prostředí a disperzními schopnostmi, ale i interakcemi s jinými organismy. Důležitá je mezidruhová kompetice s jinými druhy raků. Mezi raky byly často pozorovány agresivní interakce, ve kterých je rozhodujícím faktorem velikost soupeřících jedinců (Vorburger a Ribí 1999). Rak kamenáč je nejmenším a nejpomaleji rostoucím z evropských račích druhů (Kouba a kol. 2013), což ho ve většině mezidruhových interakcí předurčuje k roli poraženého. Pârvulescu a kol. (2013) předpokládají, že pro nespojitý výskyt raka kamenáče v Rumunsku existují dva důvody. Jedním z těchto důvodů je poloha předpokládaných glaciálních mikrorefugií (viz kapitola 1.2.4) a druhým je neschopnost raka kamenáče rozšířit se do vod obsazených kompetičně silnějším rakem říčním. Rak kamenáč celkově častěji prohrával i v experimentálních soubojích s rakem signálním (Vorburger a Ribí 1999), i když projevuje větší agresivitu při obraně umělých úkrytů. Kompetice o úkryty mezi raky má za následek vystavení slabšího kompetitora silnějšímu vlivu predace, což bylo popsáno v Anglii na lokalitách, kde rak signální vytěsňuje raka bělonohého (Dunn a kol. 2009). Invazní račí druhy mají oproti druhům původním značnou výhodu, jsou přenašeči račího moru, který pro jiné než severoamerické druhy raků smrtelný. Propuknutí račího moru často předchází samotnému kontaktu potencionálních kompetitorů (Ďuriš a kol. 2013). Původcem račího moru je parazit *Aphanomyces astaci* (Schikora, 1903). ze skupiny *Oomycetes* (Söderhäll a Cerenius_1999).

Lokality raka kamenáče jsou negativně ovlivňovány různými faktory. Nejvýznamějším z těchto faktorů je výše zmíněný parazit *Aphanomyces astaci*, původce račího moru přenášený

severoamerickými invazními raky. Šíření nepůvodních račích druhů je obecně považováno za největší hrozbu račí biodiverzity (Holdich a kol. 2009b). O račím moru v České Republice píše například Kozubíková a kol. (2006). České populace jsou navíc ohroženy predací norkem americkým *Mustela vison* (Schreber, 1777) a vydrou obecnou *Lutra lutra* (L., 1758) (Fischer a kol. 2009). Problémem pro populace raka kamenáče jsou také nevhodné úpravy toků a intenzivní rybářství a zemědělství, které mají za následek zanášení toků a račích úkrytů (Fischer a kol. 2004, Holdich a kol. 2006, Vlach a kol. 2009).

V důsledku výše popsaných faktorů je areál raka kamenáče fragmentovaný pouze na oblasti horních toků. Z toho důvodu je i velmi ztížena možnost obnovy vymřelých populací raka kamenáče přírodní cestou. Rak kamenáč u nás patří k nejohroženějším živočichům (Fischer a kol. 2004), což se odráží v tom, že je uveden v českém Červeném seznamu ohrožených druhů (Štambergová a kol. 2005). V seznamu ohrožených druhů IUCN (International Union for Conservation of Nature) je uvedena pouze klesající početnost a chybí jasné vyjádření o stavu z důvodu nedostatku dat (IUCN 2013).

Kromě toho, že jsou raci součástí evropského kulturního dědictví má jejich ochrana i praktický důvod, kterým je význam raků včetně raka kamenáče pro fungování vodních ekosystémů. Raci jsou vzhledem ke své velikosti výrazné druhy a mohou sloužit jako deštníkové druhy při ochraně celého říčního společenstva (Souty Grosset a kol. 2011). Bohužel jen málo autorů se zabývá ekologickým významem raka kamenáče. Našel jsem pouze jedinou studii zabývající se trofickými vztahy u mého modelového druhu (Weinländer a Füreder 2011). Z toho důvodu zde cituji převážně studie o jiných druzích raků. Raci jsou největší sladkovodní bezobratlí a mohou dominovat biomase zoobentosu (Haggerty a kol. 2002). Vzhledem k velikosti raků se jejich pohybové aktivity odráží na změnách v odnosu a uspořádání sedimentů a jsou tudíž považováni za ekosystémové inženýry (Statzner a kol. 2003). Raci také mohou měnit svůj habitat hrabáním nor (Holdich a kol. 2002a). Raci jsou často omnivorní. Mladí jedince se živí spíše dravě jinými druhy bezobratlých (Holdich a kol. 2006). V rakouské Karinthii je v důsledku selektivní predace rakem kamenáče silně redukována početnost máloštětinatých kroužkovců (Weinländer a Füreder 2011). Raci mají také vliv na složení společenstva primárních producentů. Důsledkem predace raka *Orconectes rusticus* na herbivorních bezobratlých bylo zvýšení množství perifytonu (Charlebois a Lamberti 1996). Rak *Orconectes rusticus* snižuje herbivorií početnost a druhovou pestrost vodních makrofyt (Lodge a Lorman 1987). V typických horních tocích obývaných rakem kamenáčem je hlavním zdrojem organického uhlíku listový opad. Zhang a kol. (2004) popisují význam raka pruhovného *Orconectes limosus* při rozkladu listového opadu. I rak kamenáč je významným rozkladačem, v tocích kde se vyskytuje bylo zjištěno větší množství rozpuštěného organického uhlíku. V tocích, kde se rak kamenáč vyskytuje ve

větších počtech, bylo zaznamenáno snížení diverzity a výskytu jiných druhů drtičů, zejména různonohých korýšů, v důsledku kompetičního vytěsnění a pravděpodobně také predace ze strany raků (Weinländer a Füreder 2011). Transformace hrubého listového opadu raky na jemné částice vede ke zvýšení množství rozpuštěného organického materiálu, který představují potravní zdroj pro ekologickou skupinu sběračů. V tocích obývaných rakem kamenáčem se potvrdila větší početnost a diverzita sběračů a jejich predátorů (Weinländer a Füreder 2011).

Z předcházející kapitoly je vidět velký vliv raků na fungování ekosystémů. Ztráta původních račích druhů a jejich nahrazení nepůvodním raky může vést ke změnám fungování ekosystému (Souty-Grosset a kol. 2011). Například rak signální vykazuje větší míru predace bezobratlých a intenzivnější spásání vodních makrofyt než původní druhy a také způsobuje větší erozi dna a břehů v důsledku norování (Freeman a kol. 2009).

1.2.4 Shrnutí současných znalostí o fylogeografii raka kamenáče

Druhový komplex raka kamenáče se oddělil od sesterského druhového komplexu raka bělonohého v důsledku výzdvihu Alp a Dinárských Alp (Rögl 1998), což vedlo k rozdělení původně spojitého areálu společného předka raků rodu *Austropotamobius*. K tomuto oddělení pravděpodobně došlo v Miocénu, odhadováno je období před 8-12 miliony let (Trontelj a kol. 2005) či 8-17 miliony let (Klobučar a kol. 2013). Populace předků raka kamenáče tak zůstaly izolované ze severu a západu hřbetu Alp a Dinárských Alp a z východu mořem Paratethys v oblasti, kde se dnes nalézá Dinárský kras (Klobučar a kol. 2013).

Na základě variability v sekvencích pro mitochondriální COI gen našli Trontelj a kol. (2005) v celém areálu raka kamenáče 3 hlavní linie haplotypů: balkánskou, středoevropskou a výrazně se lišící linii z oblasti povodí horního toku řeky Kolpy. Linie z Kolpy je z těchto tří nejstarší a oddělila se pravděpodobně před 6-9 miliony let (Trontelj a kol. 2005). V novější studii zaměřené hlavně na oblast Dinárského krasu byly nalezeny stejné linie haplotypů jako výše popsané, ale navíc byly nalezeny další čtyři linie tvořící společně se skupinou z povodí horního toku řeky Kolpy skupinu silně divergentních a izolovaných linií vyskytujících se pouze v oblasti Dinárského krasu. Pro COI se divergence mezi jednotlivými skupinami pohybuje mezi 4,1 a 8,7%, pro 16S rRNA v rozsahu 1,6 – 4,8%. Nejvyšší rozdíly jsou mezi dinárskými skupinami (Klobučar a kol. 2013). Zjištěné rozdíly zjištěné mezi dinárskými a ostatními liniemi raka kamenáče se blíží průměrným hodnotám mezidruhových divergencí v rodech ve všech třech račích čeledích (Sinclair a kol. 2003). Průměrná hodnota divergence mezi druhy v rámci rodů je u raků 5,9% divergence genu COI spočítané mezi druhy v rámci jednoho rodu Sinclairem a kol. (2003) na základě 85 sekvencí reprezentujících všechny tři

čeledi raků. Pro gen 16S uvádí Sinclair a kol. (2003) divergenci mezi druhy v rámci rodu 5,7% na základě souboru 227 sekvencí ze všech tří račích čeledí. Výsledky Sinclaira a kol. (2004) nejsou bohužel zcela porovnatelné s rodem *Austropotamobius* vzhledem k tomu, že naprostá většina zahrnutých sekvencí patří druhům z čeledi *Cambaridae*. Hodnoty divergence změřené Klobučarem a kol. (2013) se blíží a v některých případech i převyšují dříve naměřené hodnoty mezi výrazně se lišícími genealogickými liniemi raka bělonohého *A. italicus* a *A. pallipes pallipes*, které jsou některými autory považovány za samostatné druhy (Zaccara a kol. 2004, Grandjean a kol. 2000, Fratinia a kol. 2005). Například Fratinia a kol. (2005) změřili mezi liniemi *A. pallipes pallipes* a *A. italicus* rozdíl $3,5 \pm 0,73\%$ pro 16S gen. Druhový status jednotlivých linií raka bělonohého je ale stále diskutován (Trontelj a kol. 2005, Chiesa a kol. 2011). Pro vyřešení taxonomie celého rodu *Austropotamobius* bude třeba dalšího výzkumu. I když nelze zatím určit taxonomický statut dinárských linií raka kamenáče, lze alespoň říct, že linie z dinárské oblasti představují jednu nebo více evolučně signifikantních jednotek. Evolučně signifikantní jednotky jsou historicky izolované skupiny populací, které představují samostatnou část evolučního dědictví a při jejichž ochraně by měl být brán zřetel na jejich jedinečnost (Moritz 1994).

Vysoká genetická divergence linií raka kamenáče v Dinárském krasu není překvapivá. Jde o oblast, kde byla zjištěna velká diverzita (genetická i morfologická) u více sladkovodních živočichů. Vysoká míra genetická divergence v této malé oblasti lze vysvětlit velkou fragmentací povodí, která se utvářela v průběhu neotektonických pohybů během pliocénu a na začátku pleistocénu a v průběhu vzniku krasu. Tyto procesy vedly kromě raka kamenáče k vyšší míře genetické diverzity například u lokálních populací berušky vodní *Asellus aquaticus* (Verovnik a kol. 2003 a 2004) nebo endemického chrostíka rodu *Drusus* (Previšić a kol. 2009). Klobučar a kol. (2013) předpokládají, že dlouhé přežívání ve stabilně studených vodách Dinárského krasu vedlo u raka kamenáče k utváření jeho teplotních nároků.

Nejstarším rozdělením mezi liniemi raka kamenáče je oddělení dvou skupin dinárského krasu datované do pozdního Miocénu nebo raného Pliocénu (Klobučar a kol. 2013), což odpovídá době, do které je datováno oddělení linie z horního povodí Kolpy (Trontelj a kol. 2005). Následovalo oddělení dinárských skupin linií od ostatních skupin v průběhu Pliocénu. V pozdním Pliocénu došlo k oddělení balkánských linií a linie středoevropské (Klobučar a kol. 2013).

Vztahy mezi jednotlivými liniemi haplotypů naznačují, že k šíření raka kamenáče v oblasti Dinárského krasu ze severu na jih došlo před začátkem Pleistocénu. Nejjižnější z dinárských

skupin je také nejpříbuznější balkánským skupinám. Na jih Balkánu se rak kamenáč rozšířil pravděpodobně na začátku pliocénu (Klobučar a kol. 2013).

Na jihu Balkánu se nachází centrum diverzity ostatních linií *A. torrentium* (klasický druh *A. torrentium*) a pravděpodobně i jejich glaciální refugium. Zatím bylo na Balkánském poloostrově nalezeno 6 parafyletických linií jejichž rozdělení je datované do období před 3–4 miliony let. Vysoká diverzita na Balkánském poloostrově je vysvětlována dlouhodobým přežíváním raka kamenáče v této oblasti po celé období pleistocénu. Velká divergence balkánských linií odpovídá přežívání jednotlivých linií ve vzájemně izolovaných povodích. Při přežívání v malých oddělených povodích docházelo pravděpodobně k náhodnému vymírání některých linií, takže se do dnešní doby zachovalo jen omezený počet výrazně se lišících linií (Trontelj a kol. 2005).

Střední a jihovýchodní Evropa byla kolonizována v průběhu Pleistocénu povodím Dunaje jednou z balkánských linií (Trontelj a kol. 2005). Nejdříve se tato linie rozšířila do oblasti na jih od Alp, kde se na dvou místech předpokládají možná glaciální mikrorefugia. Mikrorefugia se předpokládají na jihovýchodě Alp (Trontelj a kol. 2005) a ve dvou karpatských krasových oblastech v Rumunsku (Pârvulescu a kol. 2013 v tisku). Alpská mikrorefugia byla navržena pro vysvětlení vyšší genetické diverzity na jihovýchodě Alp (Trontelj a kol. 2013) a krasová refugia v Rumunsku jsou předpokládána na základě nespojitého výskytu soustředěného do dvou oblastí v okolí krasových oblastí (Pârvulescu a kol. v tisku). Rak kamenáč mohl přežít v krasových mikrorefugiích období glaciace, ale po konci poslední doby ledové se nedokázal rozšířit do větších částí povodí Dunaje v Rumunsku, protože se do těchto oblastí rozšířil z jihu kompetičně silnější rak říční (Pârvulescu a kol. v tisku). Oblast na sever od Alp byla pravděpodobně osídlena jednou kolonizační vlnou krátce po konci poslední doby ledové (Trontelj a kol. 2005).

Při popisu fylogeografie raka kamenáče je třeba uvažovat i jeho ekologické nároky. S ohledem na nároky raka kamenáče na nízkou teplotu lze předpokládat, že k šíření na větší vzdálenosti docházelo hlavně v chladných obdobích (Klobučar a kol. 2013). K ochlazení klimatu došlo na začátku Pliocénu (Erdei a kol. 2007), v době kdy rak se rak kamenáč rozšířil z Dinárského krasu na jih Balkánu (Klobučar a kol. 2013). Další chladné období bylo například na konci poslední doby ledové (Erdei a kol. 2007), kdy rak kamenáč rekolonizoval oblast na sever od Alp (Trontelj a kol. 2005, Klobučar a kol. 2013).

Další ekologickou vlastností raka kamenáče, která byla diskutována při vysvětlení jeho rozšíření v Rumunsku, je jeho schopnost tvořit jeskynní populace (Pârvulescu a kol. v tisku) (viz kapitola 1.2.4). Pârvulescu a kol. (v tisku) totiž předpokládají, že karpatská krasová

mikrorefugia mohla být jeskynního charakteru.

2 Cíle práce

Klíčovým cílem celé studie zaměřené na analýzu variability COI v populacích v povodí Labe bylo otestovat, zda genetická data mohou podpořit či vyvrátit hypotézu, že rak kamenáč je v povodí Labe původním druhem.

Dosažení tohoto hlavního cíle vyžaduje splnění několika dílčích cílů. Prvním z těchto dílčích cílů je získání a popsání souboru dat o genetické diverzitě raka kamenáče v povodí Labe a dalších částech střední Evropy na sever od Alp.

Druhým dílčím cílem je porovnání genetické diverzity v rámci střední Evropy a celého areálu, pro které byl výše popsán soubor dat rozšířen o sekvence z dříve publikovaných prací. Cílem tohoto porovnání bylo zjistit zda je rozložení haplotypové diverzity v povodí Labe podobné jako v jiných částech areálu na sever od Alp, což by bylo v souladu s předpokladem osídlení střední Evropy jednou kolonizační vlnou jedné haplotypové linie raka kamenáče a přirozeného původu našich populací. Hlavní důraz byl dán na srovnání situace v povodí Labe a v části povodí Dunaje a Rýna v jižním Německu. Jižní Německo je totiž předpokládaným místem původu populací z povodí Labe.

Druhým hlavním cílem mé práce bylo nalezení vhodných kombinací primerů pro amplifikaci prodloužené sekvence genu COI, která by umožnila zvýšení rozlišení dat při zachování možnosti srovnání se staršími daty.

3 Metodika

3.1 Lokality

Část ze zpracovaných vzorků z povodí Labe byla odebrána v rámci mapování výskytů raků v ČR, které bylo organizováno v letech 2007-2008. Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR. Vzorky pro genetické analýzy byly odebírány z předem vybraných lokalit, které by měly dobře reprezentovat české populace. Další vzorky pak byly získány v sezóně 2009.

Vzorky z referenčních lokalit na horním toku Dunaje a Rýnu byly odebrány v sezóně 2011 Christophem Chuchollem. Vzorky z lokality v jižním Sasku (bezejmenný potok na předměstí Drážďan, kde byla přítomnost raka kamenáče objevena v roce 2007; Martin a kol. 2008) odebral Peer Martin v roce 2008. Seznam všech lokalit je uveden v tabulce 1. Mapa lokalit v povodí Labe je na obrázku 1. Vzorky ze dvou lokalit v Malých Karpatech na Slovensku

odebíral Adam Petrusek s Eduardem Stloukalem v roce 2006.

Tabulka 1: Seznam lokalit a haplotypů raka kamenáče (poznámka: lokalita Drážďany odkazuje na bezejmenný potok v blízkosti Drážďan. Řeka Eger není Ohře, ale jiný německý tok se stejným názvem)

Lokalitty v povodí Labe:					
Název lokality:	Kód názvu lokality:	Haplotypy na lokalitě:	N sekvencí haplotypů	Povodí:	Haplotypová diverzita
Bertinský potok	BER	ht1	10	Berounka	0
Bojovka	BOJ	ht1	4	Úslava	0
Bradava	BRA	ht1	10	Úslava	0
Huníkovský potok	HUP	ht1	10	Ploučnice	0
Chocenický potok	CHO	ht1	10	Úslava	0
Luční potok (Podkrkonoší)	LK1	ht1	5	Labe	0
Luční potok (České středohoří)	LPL	ht1	2	Labe	0
Míza	MIZ	ht1	2	Berounka	0
Oupoř 1	OUP1	ht1	7	Berounka	0
Oupoř 2	OUP2	ht1	8	Berounka	0
Padrt'ský potok	PAD	ht1	10	Klabava	0
Příchovický potok	PRI	ht1	12	Úhlava	0
Rakovský potok	RAP	ht1	10	Klabava	0
Radotínský potok	RDT	ht1 a ht3	8 a 2	Berounka	0,68
Stroupínský potok	STR	ht1	10	Litavka	0
Trebušín	TRE	ht1	3	Labe	0
Úpořský potok	UPO	ht1	10	Berounka	0
Všenorský	VSE	ht1	10	Berounka	0
Zbirožský potok	ZBI	ht1 a ZBI2M	5 a 1	Berounka	0,28
Zákolanský potok	ZKL	ht1	11	Vltava	0
Zubřina	ZUB	ht1	1	Radbuza	0
Drážďany	DRA	ht1	21	Labe	0
Referenční lokality v povodí Dunaje a Rýnu					
Bottwar	BOTT	ht1 a ht3	1 a 1	Neckar (Rýn)	0,5
Goldbach	GOL	ht1	5	Eger (Dunaj)	0
Leimenbach	LEI	ht1	6	Bodamské jezero (Rýn)	0
Wielandsbach	WIE	ht1 a WIE10	7 a 1	Bodamské jezero (Rýn)	0

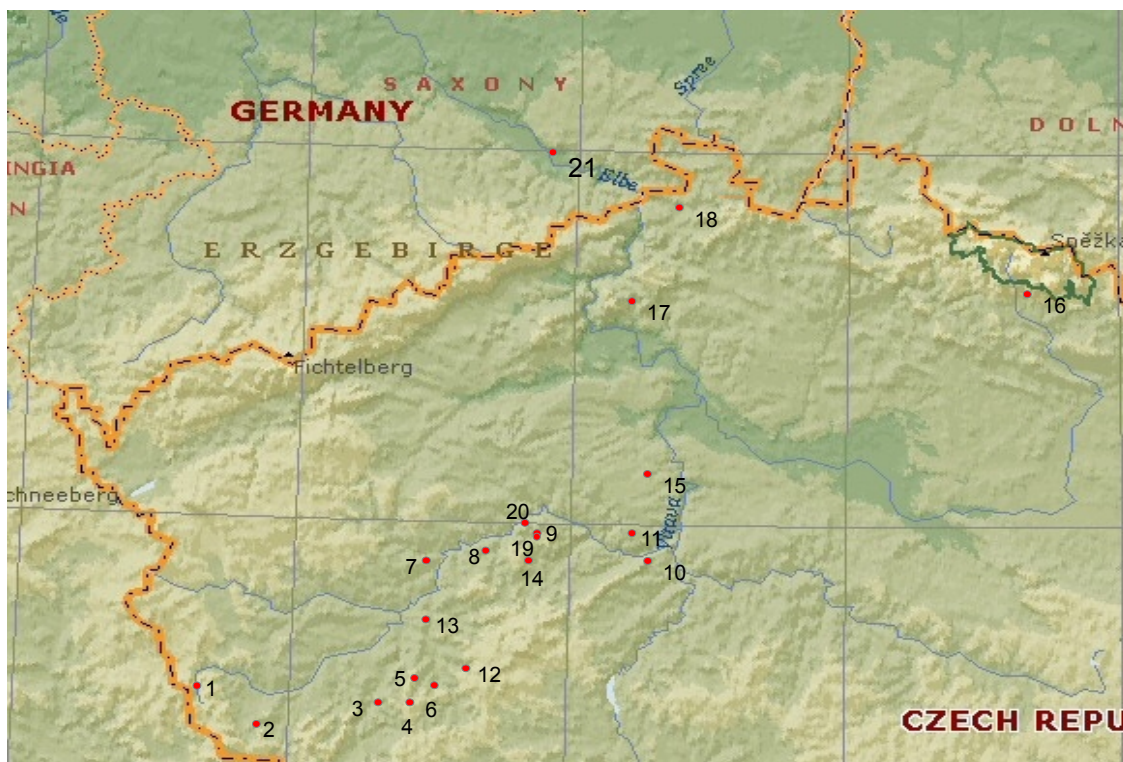
3.2 Sběr vzorků

Raci byli na lokalitě chytáni ručně při prohledávání úkrytů. Za možné úkryty byly považovány volné prostory pod kameny nebo jinými předměty, obnažené kořenové systémy nebo větve živých i mrtvých stromů v toku, jemný naplavený sediment, spadané listí, vyhrabané úkryty (račí nory) v břehu nebo dně, prostory pod kameny v blízkosti vysychajícího koryta. V regulovaných tocích byly jako úkryty také prohledávány mezery mezi opevňovacími prvky (Dušek a kol. 2009).

Ke genetickým analýzám prováděným v této studii je zapotřebí jen malý kus tkáně (několik mm³). To znamená, že vzorek lze odebírat bez usmrcení jedince. Aby se co nejméně omezil dopad na životaschopnost jedince, byla odebírána jedna kráčivá končetina (pereopod) čtvrtého nebo pátého páru. Pereopod byl odlomen v některém z nožních kloubů přednostně blízko trupu, tj. v místě, kde jsou obecně raci dobře přizpůsobeni k autotomii (Ďuriš a kol. 2013). V několika případech došlo náhodně během odchytu k odlomení klepeta. Odlomený pereopod či klepeto byly uloženy do plastové zkumavky o objemu min. 1,5 ml a konzervovány 96% čistým etanolem. Zároveň byl do každé zkumavky vložen proužek papíru s tužkou zapsanými údaji (kód lokality, číslo jedince a pohlaví). Etanol byl po několika minutách vyměněn za nový, výměna fixáže pak byla opakována po několika hodinách nebo dnech. Vzorky byly dlouhodobě skladovány při teplotě -20°C.

3.3 Laboratorní zpracování vzorků

Z pereopodu nebo klepeta uloženého v etanolu byl pomocí skalpelu a pinzety vypreparován kus svalové tkáně přibližně o objemu 1 mm³. Etanol z vypitvaného svalu se následně nechal odpařit na vzduchu. Před pitváním dalšího vzorku byly pitevní nástroje vždy sterilizovány očištěním a postupným opláchnutím v peroxidu vodíku, destilované vodě a 96% etanolu. Pro izolaci DNA byl použit protokol využívající substanci Chelex pro odstranění iontů, které by mohly ovlivnit následnou amplifikaci DNA (Nobel 2000). Tkáň byla vložena do označené mikrozkušavky obsahující 5 µl proteinázy K (20 mg/ml) a 175 µl vody (deionizované, autoklávované). Tkáň v mikrozkušavce byla homogenizována, poté bylo přidáno 175 µl vody a byl zopakován proces homogenizace. Poté bylo do zkumavky přidáno malé množství kuliček Chelex 100 (přibližně 50 µl). Mikrozkušavky byly během pitvání a homogenizace udržovány na ledu. Pak byly jemně zamíchány a následující 4 hodiny inkubovány ve vodní lázni o teplotě 56 °C. Po inkubaci ve vodní lázni byly vzorky 8 minut ohřívány v blokové lázni při teplotě 96 °C. Poté byly stáčeny v centrifuze po dobu 4 minut při rychlosti 12000 otáček za minutu za účelem odstranění kuliček Chelexu a pevných zbytků tkáně. Po centrifugaci byla svrchní část roztoku přepipetována do druhé sady popsaných zkumavek. Získané izoláty DNA byly uskladněny v mrazáku při teplotě -20°C.



Obrázek1: Mapa ovzorkovaných lokalit raka kamenáče v povodí Labe. 1. Radbuza, 2. Zubřina, 3. Příchovecký potok, 4. Chocenický potok, 5. Bradava, 6. Bojovka, 7. Bertínský potok, 8. Zbirožský potok, 9. Úpořský potok, 10. Všenorský potok, 11. Radotínský potok, 12. Padrťský potok, 13. Rakovský potok, 14. Stroupinský potok, 15. Zákolanský potok, 16. Luční potok (Podkrkonoší), 17. Luční potok (České Středohoří), 18. Huníkovský potok, 19. Míza, 20. Oupora, 21. Drážďany.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) pro amplifikaci mitochondriálního genu pro podjednotku I cytochrom c oxidázy probíhala v objemu 25 μ l, obsahujícím 23 μ l předem připravené reakční směsi („master mix“) a 2 μ l izolátu DNA (\approx 100 ng). Pro amplifikaci byly použity jednak primery COI-F a COI-R (Folmer 1994) běžně používané pro získání úseku genu COI o délce přibližně 600 párů bazí (bp) u řady druhů bezobratlých živočichů i obratlovců (Hebert a kol. 2003).

Navíc jsem otestoval dvě kombinace primerů, které byly u raka kamenáče použity poprvé. Obě tyto dvojice by při úspěšné amplifikaci měly umožnit získání delšího úseku genu COI, který by zahrnoval celý kratší úsek a zároveň ho prodloužil přibližně o 500 bp, což by umožnilo zvýšit rozlišení dat o variabilitě tohoto genu raka kamenáče při zachování možnosti porovnání se staršími daty.

Primery použitými pro amplifikaci delšího úseku genu COI byly dvojice COI-F a COX-R (Braband a kol. 2006) (výsledné sekvence by měla mít délku přibližně 1120 bp) a dvojice COI-F a Scylla (Gopurenko a kol. 1999) (výsledná sekvence by měla mít délku přibližně 1180. Oba reverzní primery pro dlouhý úsek genu COI byly pro raka kamenáče v kombinaci s přímým primerem COI- F použity poprvé, ale byly vybrány na základě jejich dřívějšího použití. Primer CoxREV byl použit s primerem CoxFOR pro více druhů raků ze skupiny Astacoidea včetně raka kamenáče (Braband a kol. 2006). Kombinace primerů COI-F a Scylla byla použita u raka *Austropotamobius italicus* z druhového komplexu raka bělonohého, sesterského k raku kamenáči (Matallanas a kol. 2011).

Sekvence použitých primerů jsou následující:

COI-F: 5'- GGTCAACAAATCATAAAGATATTG

COI-R: 3'- TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

CoxREV: 5'-ACTCCCACARATATTGTAA

Scylla: 5' TTAAGTCCTAGAAAATGTTGRGGGA

PCR probíhala na přístroji iCycler Thermal Cycler (BIO-RAD). Složení reakční směsi a nastavení teplot cycleru PCR pro krátký fragment genu COI původně vycházely z práce Filipové a kol. (2010) a pro dlouhý fragment amplifikovaný primery COI-F a CoxREV z práce Brabandové a kol. (2006) a pro amplifikaci primery COI-F a Scylla z práce Matallanasové a kol. (2011), ale postupně byly optimalizovány do odlišné podoby.

Optimalizace nastavení teplotních cyklů spočívalo u všech dvojic primerů v testování teploty nasedání primerů. Nastavení teplotních cyklů PCR reakce je vidět v tabulce 2. Optimalizace složení reakční směsi zahrnovala u všech tří dvojic primerů zkoušení různých koncentrací primerů a různých koncentrací $MgCl_2$ (O optimalizaci PCR pojednává například Innis a Gelfand 1990) Koncentrace a množství jednotlivých složek reakční směsi je uvedeno v tabulce 2. Za optimální byly považovány takové parametry, při kterých vyšla nejlépe kontrola agarózovou elektroforézou (viz dále).

Pro amplifikaci krátkého fragmentu COI byl také použit předmíchaný master mix Combi PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o). podle návodu doporučeného výrobcem s úpravou spočívající ve snížení množství primerů na polovinu, takže reakční směs pro jeden vzorek obsahovala: 12,5 μ l Combi PPP Master Mixu, a po 0,5 μ l ze zásobního roztoku o koncentraci 10 μ M od obou primerů. Tato směs byla doplněna deionizovanou autoklávovanou vodou na

objem 24 μ l a poté k ní byl přidán 1 μ l templátové DNA. Byl zachován celkový objem reakce 25 μ l doporučený výrobcem.

Tabulka 2: Použité nastavení teplotních cyklů PCR						
			Použité dvojice primerů:			
			COI-F a COI-R, COI-F a CoxREV		COI-F a Scylla	
Cyklus:	Počet opakování	Typ reakce:	Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)
Cyklus 1	1	Počáteční denaturace	94	150	94	300
Cyklus 2	43	Denaturace	94	45	94	45
		Přisídání primerů	50	75	49	60
		Prodlužování	72	60	72	75
Cyklus 3	1	Finální prodlužování	72	600	72	600
Cyklus 4	1	Ochlazení produktů po skončení reakce	10	∞	4	∞

Výsledek reakce byl zkontrolován pomocí agarózové elektroforézy. 1,5% gel byl připraven rozpuštěním a převařením 0,75 g agarózy v 50 ml TBE pufru. Ke gelu byl před jeho ztuhnutím přidán 1 μ l fluorescentního barviva vážícího ho se na nukleotidové kyseliny GelRed™ (Biotium). Do jednotlivých jamek v gelu bylo napipetováno po 4 μ l směsi skládající se ze 2 μ l PCR produktu a 2 μ l barviva Gel Pilot Loading Dye (Quiagen). Elektroforéza probíhala v TBE pufru po dobu 30 minut při napětí 150 V a proudu 500 mA. Po dokončení elektroforézy byl gel osvětlen UV lampou za účelem vizualizace proužků DNA. Jako správný výsledek bylo hodnoceno, pokud každý vzorek vyšel jako jeden silný pruh, jehož pozice odpovídala očekávané délce amplifikovaného fragmentu (viz výše). Správná délka byla zjišťována optickým porovnáním srovnáním s žebříkem 1kb DNA Marker (0,2 μ g/ μ l) (Segetetic).

Tabulka 3: Složení optimální směsi chemikálií pro jeden vzorek				
Složení směsi pro dvojice primerů COI-F, COI-R a COI-F, CoxREV				
Složka směsi:	Koncentrace zásobních roztoků:	Jednotky koncentrace:	Koncentrace ve směsi:	Množství ve směsi (μl):
MgCl ₂	25	mM	2	2
Reakční pufr s KCl (Thermo Scientific)	10	x	1	2,5
dNTP Mix	2	mM	0,2	2,5
Taq polymerase (recombinant) (Thermo Scientific)	1	U/reakci	0,8	0,8
COI-F	10	μM	0,2	0,5
COI-R/COX-R	10	μM	0,2	0,5
H ₂ O (deionizovaná autoklávovaná)	-	-	-	14,2
Celkový objem			-	23
Složení směsi pro dvojici primerů COI-F a Scylla				
Složka směsi:	Koncentrace zásobních roztoků	Jednotky koncentrace	Koncentrace ve směsi	Množství ve směsi
MgCl ₂	25	mM	2	2
Reakční pufr s KCl (Thermo Scientific)	10	x	1	2,5
dNTP Mix	2	mM	0,2	2,5
Taq polymerase (recombinant) (Thermo Scientific)	1	U/reakci	0,8	0,8
COI-F	10	μM	0,5	1,25
COI-R/COX-R	10	μM	0,5	1,25
H ₂ O (deionizovaná autoklávovaná)	-	-	-	12,7
Celkový objem				

Výsledek reakce byl zkontrolován pomocí agarózové elektroforézy. 1,5% gel byl připraven rozpuštěním a převařením 0,75 g agarózy v 50 ml TBE pufru. Ke gelu byl před jeho ztuhnutím přidán 1 μl fluorescentního barviva vážícího ho se na nukleotidové kyseliny GelRed™ (Biotium). Do jednotlivých jamek v gelu bylo napipetováno po 4 μl směsi skládající se ze 2 μl PCR produktu a 2 μl barviva Gel Pilot Loading Dye (Quiagen). Elektroforéza probíhala v TBE pufru po dobu 30 minut při napětí 150 V a proudu 500 mA. Po dokončení elektroforézy byl gel osvětlen UV lampou za účelem vizualizace proužků DNA. Jako správný výsledek bylo hodnoceno, pokud každý vzorek vyšel jako jeden silný pruh, jehož pozice odpovídala očekávané délce amplifikovaného fragmentu (viz výše). Správná délka byla zjišťována optickým porovnáním srovnáním s žebříkem 1kb DNA Marker (0,2 μg/μl)

(Segetic).

Po kontrole amplifikace dlouhého úseku genu COI pomocí primerů COI-F a Scylla byla navíc použita gelová extrakce, za účelem oddělení dvou fragmentů, které vznikaly ve všech případech při použití primerů COI-F a Scylla bez ohledu na různé obměny nastavení teplotních cyklů PCR (byla zkoušena teplota nasedání primerů v rozsahu 49 -53°C) a složení reakční směsi. Jeden z těchto fragmentů měl délku odpovídající očekávaným 1180 bp a druhý byl kratší o délce přibližně 500 bp. Optimální protokol nastavení cycleru a složení reakční směsi pro dvojici primerů COI-F a Scylla uvedený v tabulce 1 a 2 je ten, ve kterém vycházel nejsilněji pruh s délkou 1180 bp.

Extrakce fragmentů z gelu byla prováděna pomocí sady PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) podle přiloženého protokolu výrobce. Prvním krokem extrakce z gelu bylo zopakování agaróзовé elektroforézy s hustším 2% gelem s většími jamkami, do kterých se odměřilo pipetou 15 µl produktu a 5 µl barviva Gel Pilot Loading Dye. Elektroforéza běžela 2 hodiny při napětí 120 V a proudu 500 mA, aby došlo k dostatečnému oddělení obou pruhů. Proužky odpovídající jednotlivým fragmentům byly co nejpřesněji vyříznuty z gelu pomocí čistého skalpelu pod UV lampou. Vyříznuté kusy gelu byly zváženy a uloženy do dvou sad popsaných zkumavek o objemu 1,5 ml. V druhém kroku se přidávalo do zkumavek množství pufru rozpouštějícího gel (Gel Solubilization buffer L3) odpovídající váze jednotlivých kusů gelu a koncentraci gelu. Zkumavky byly inkubovány ve vodní lázni o teplotě 50°C, dokud se gel nerozpustil (minimálně 10 minut) a následně ještě 5 minut po rozpuštění gelu. Během této inkubace byly zavřené zkumavky vždy po třech minutách otočeny dnem vzhůru, aby došlo k promíchání obsahu. Rozpuštěné vzorky byly přepipetovány do extrakčních kolonek sloužících k zachycení DNA při promývání (Quick Gel Extraction Column) vložených do speciálních proplachovacích zkumavek (Wash tube). Ke vzorkům bylo následně přidáno 500 µl pufru (Wash buffer W1). V těchto zkumavkách byly vzorky stáčeny rychlostí 12000 g po dobu jedné minuty, poté byl odstraněna kapalina proteklá extrakčními kolonami a byl zopakován proces centrifugace. Následně byly extrakční kolonky se vzorky přemístěny do poslední sady zkumavek a bylo k nim přidáno 50 µl deionizované autoklávované vody, která byla použita pro vymytí DNA z extrakčních kolonek při poslední centrifugaci. Voda byla vybrána jako vhodnější promývací médium po konzultaci se zaměstnanci Laboratoře sekvenace DNA biologické sekce PŘF UK, kteří uvedli zkušenosti s horšími výsledky sekvenace u vzorků rozpuštěných v promývacím pufru dodaným výrobcem (Elution buffer E5).

Produkty PCR pro dvojice primerů COI-F, COI-R a COI-F, CoxREV, u kterých

elektroforéza ukázala správný průběh PCR, byly dále přečištěny etanolovou a octanovou purifikací PCR produktů. Při tomto postupu byly vzorky doplněny na objem 100 µl vody. Takto naředěné vzorky byly přepipetovány do popsaných zkumavek o objemu 1,5 ml a byla k nim přidána 1/10 objemu octanu sodného (10 µl) a dvojnásobek objemu vymraženého 99,9% lihu (200 µl). Zkumavky byly promíchány a 10 minut stáčeny rychlostí 14000 otáček za minutu (RPM). Po skončení centrifugace byla pipetou odsáta většina kapaliny (DNA produkt se vysráží u dna). Do nyní téměř prázdných zkumavek bylo přidáno 100 µl vymraženého 75% lihu. Obsah zkumavek byl opět promíchán, stočen a odsát. Zkumavky se následně daly vysušit do blokové lázně při teplotě 40°C minimálně na dvě hodiny. Po vysušení byla purifikovaná DNA rozředěna vodou na objem 20 µl.

Úspěšný průběh purifikace a gelové extrakce byl zkontrolován zopakováním elektroforézy a změřením koncentrace a spektra vzorků na přístroji NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific).

Vzorky, které prošly kontrolou po purifikaci a gelové extrakci byly odeslány na sekvenaci buď do korejské firmy MacroGen nebo do Laboratoře sekvenace DNA biologické sekce PřF UK. Obě laboratoře posílaly výsledné sekvence elektronickou poštou během několika dní.

Příprava vzorků na odeslání společnosti MacroGen Inc. spočívala v jejich přepipetování do mikrozkušavek, doplnění vzorků na objem 30 µl a zabalení mikrofilmem proti otevření. Se vzorky se navíc posílaly mikrozkušavky s přesně určeným množstvím primerů. Služeb společnosti MacroGen bylo použito jen při první sekvenaci dlouhého fragmentu genu COI.

Pro odeslání do Laboratoře sekvenace DNA biologické sekce PřF UK bylo třeba přepipetovat 7,5 µl od každého vzorku do vlastní mikrozkušavky. Ke všem vzorkům se pak přidávalo po 0,5 µl primeru. Při první zkušební sekvenaci v sekční laboratoři byly vzorky sekvenovány z obou směrů, při dalších sekvenacích byly vzorky sekvenovány jen z reverzního směru. V obou směrech byly poté sekvenovány jen vzorky, u kterých bylo třeba ověřit přítomnost bodové mutace a vzorky sekvenované za účelem získání dlouhého úseku genu COI.

3.4 Zpracování dat a analýzy

Všechny sekvence byly upravovány v programu MEGA 5.05 (Tamura a kol. 2011) postupným přidáváním jednotlivých sekvencí k alignmentu, který byl tvořen ručně nebo pomocí algoritmu ClustalW (Higgins a kol. 1994). Sporná místa byla ověřována a případně

opravována porovnáním s chromatogramem dané sekvence v programu Chromas 2.4 (Technelysium Pty Ltd). Správná úprava sekvencí byla v programu MEGA také kontrolována pomocí překladu sekvence DNA do sekvence aminokyselin (AMK) dle kódu pro mitochondriální geny bezobratlých živočichů. Gen COI je genem kódujícím bílkovinu a neměl by obsahovat stop kodóny nebo mezery v sekvenci, které by narušily přepis DNA sekvence do AMK (Buhay 2009). Stopkodón je triplet nukleotidů signalizující konec translace (Griffiths a kol. 2000). Pro kontrolu, zda nalezené haplotypy byly již dříve publikovány, byly prohledány veřejné databáze sekvencí pomocí nástroje BLAST (Altschul a kol. 1990).

U sekvencí získaných pomocí primerů pro dlouhý úsek genu COI byla v alignmentu navíc kontrolována část odpovídající krátkému úseku genu COI (tato část by měla být mezi krátkým a dlouhým úsekem genu COI identická). Pro znázornění míry podobnosti těchto sekvencí a standardní sekvence pro krátký úsek genu COI byla spočtena nekorigovaná hodnota divergence (p-distance) vypočítaná pro odpovídající úseky sekvencí v programu MEGA. U získaných sekvencí, které se lišily od krátkého úseku byl navíc použit nástroj BLAST pro vyhledání nejpodobnějších sekvencí jiných druhů.

Pro názornější vyjádření prostorového rozložení haplotypové diverzity raka kamenáče v povodí Labe byla použita haplotypová síť, která byla vypočítána v programu Network 4.6.11 (Fluxus Technology Ltd) pomocí metody Median-Joining. Síť byla překreslena v programu OpenOffice.org 3.1.1 (Sun Microsystems). Použitý soubor sekvencí z povodí Labe zahrnoval kromě mnou získaných sekvencí i 69 sekvencí z pilotní studie genetické diverzity raka kamenáče v povodí Labe zpracované pod vedením Adama Petruska na katedře ekologie PřF UK Danem Leštinou během jeho gymnaziálního studia, a 21 sekvencí ze saské populace, které získal Adam Petrusek a Peer Martin. Genetická heterogenita uvnitř populací raka kamenáče v povodí Labe byla odhadnuta pomocí výpočtu haplotypové diverzity ($h = 1 - \sum f_i^2$, kde f_i je frekvence haplotypu i).

Pro porovnání údajů o genetické diverzitě v povodí Labe se situací v jiných částech střední Evropy, byl soubor dat z referenčních lokality na horním toku Dunaje a Rýna rozšířen o data ze studie Schubarta a Hubera (2006). Z této studie bylo převzato celkem 45 sekvencí ze 41 lokalit z Německa, Švýcarska a Rakouska (naprostá většina z jižního Německa). Zahrnuty také byly 4 sekvence ze studie Trontelja a kol. (2005). Zahrnuto bylo také 6 sekvencí ze vzorků ze dvou lokalit v Malých Karpatech, kde byl nedávno potvrzen výskyt raka kamenáče (Stloukal a Harvánková 2005). Sekvence ze vzorků z Malých Karpat zpracoval v laboratoři katedry ekologie PřF UK Dan Leština. Pro účely vzájemného porovnání byly všechny sekvence zkráceny na délku 582 bp.

Jako vhodná metoda vyjádření vztahů mezi haplotypy genu COI raka kamenáče v rámci celého areálu byl zvolen fylogenetický strom a haplotypová síť. Fylogenetický strom byl vytvořen v programu MEGA 5.05 metodou maximum likelihood, pro evoluci genu byl použit model Hasegawa Kishino Yano (Hasegawa a kol. 1985) s diskrétní Gamma distribucí (nejvhodnější model evoluce byl vybrán v programu MEGA pomocí Bayesovského informačního kritéria). Jako outgroup byla použita sekvence raka říčního stažená z GenBank. Do tohoto stromu byly zahrnuty kromě výše zmíněných haplotypů další haplotypy z celého evropského areálu (Trontelj a kol. 2005) a z oblasti Dinárského krasu (Klobučar a kol. 2013). Haplotypová síť byla vypočítána a upravena stejným způsobem jako síť pro povodí Labe. Při tvorbě sítě nebyly z důvodu lepší přehlednosti zahrnuty velmi divergentní skupiny haplotypů z Dinárského krasu a pro snadnější zpracování sítě byla použita před-kalkulační kontrakce, metoda Star contraction (Forster a kol. 2001). Pro znázornění míry podobnosti skupin haplotypů byla vypočítána genetická divergence mezi skupinami (p-distance).

4 Výsledky

4.1 Genetická diverzita raka kamenáče

4.1.1 Rozšíření souboru dat o genetické diverzitě raka kamenáče v povodí Labe

Pro popis genetické diverzity populací raka kamenáče v povodí Labe byl vytvořen soubor 181 sekvencí krátkého úseku genu COI o délce 617 bp ze 22 lokalit (Obr. 1). V tomto souboru byly detekovány čtyři haplotypy. Na 20 českých (tj. všech s výjimkou jedné) a jediné známé saské lokalitě (Drážďany; Martin a kol. 2008) byl nalezen haplotyp ht1. U jednoho jedince ze Zbirožského potoka byl nalezen vzácný haplotyp označený podle příslušného jedince jako ZBI2M. Haplotyp ZBI2M byl dosud nalezen pouze v této studii a je zatím unikátní pro povodí Labe. Další vzácný haplotyp ht3 byl nalezen u dvou jedinců z Radotínského potoka. Oba tyto vzácné haplotypy (ZBI2M a ht3) se od dominantního haplotypu ht1 lišily jednou substitucí. U pěti jedinců z Lučního potoka v Podkrkonoší byl nalezen vzácný haplotyp Logatec lišící se třemi substitucemi. Tento haplotyp byl dříve nalezen v pěti populacích v okolí města Logatec ve středním Slovinsku, méně než 20 km od centra Lublaně (Schubart a Huber 2006). Informace o výskytu haplotypů, jejich substitucích a počtu sekvencí jsou v tabulce 3. Vztahy mezi jednotlivými haplotypy a množstvím lokalit, na kterých byly nalezeny, jsou zobrazeny formou haplotypové sítě na obrázku 2.

4.1.2 Genetická diverzita raka kamenáče ve střední Evropě

Pro popis genetické diverzity raka kamenáče ve střední Evropě byl soubor dat z povodí Labe rozšířen o sekvence z povodí Dunaje a Rýna ze studie Schubarta a Hubera (2006) a Trontelja a kol. (2005), 21 nově získaných sekvencí ze 4 lokalit z oblasti Bádenska-Württemberska a 7 sekvencí ze dvou lokalit v Malých Karpatech. Celkem tak bylo pro střední Evropu hodnoceno 247 sekvencí z 63 lokalit ze tří velkých středoevropských povodí, kde se rak kamenáč vyskytuje. Nejrozšířenějším haplotypem byl haplotyp ht1. Kromě tohoto haplotypu bylo nalezeno 8 vzácných haplotypů. Konkrétní informace o výskytu, počtu sekvencí a substitucích středoevropských haplotypů jsou shrnuty v tabulce 3.

Sekvence APT-Rouderbaach a APT-Breisgau jsou převzaté z práce Trontelje a kol. (2005). Tyto sekvence mají délku 585 bp a v alignmentu jsou posunuty, neboť jim chybí 76 bp na začátku sekvence. Ve celé dostupné délce odpovídají jiným středoevropským haplotypům (viz tabulka 3), ale nelze vyloučit, že neosekvenovaná část mohla obsahovat bodové mutace, jimiž by se tyto haplotypy lišily.

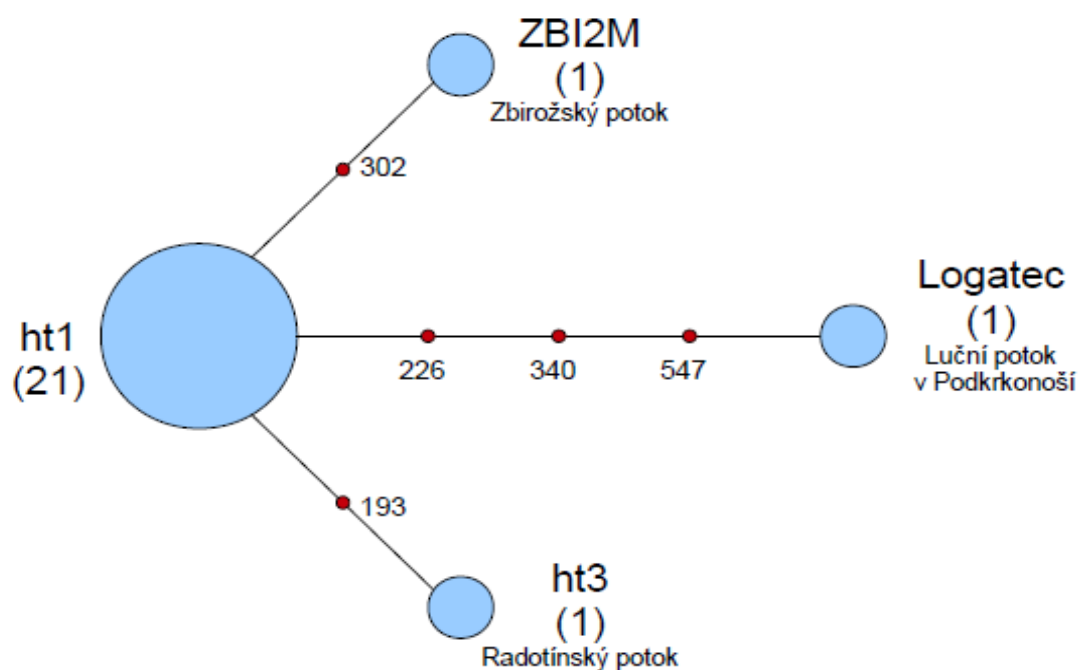
Z hlediska střední Evropy se liší oblast Bavorských Alp a sousedící části Rakouska (lokality Allgäu a Haldensee). Na tomto relativně malém území (v porovnání se zbytkem studované části středoevropských povodí) se vyskytují tři vzácné haplotypy ht2, ht3 a ht4.

Podle počtu lokalit je nejrozšířenějším ze vzácných haplotypů haplotyp ht3, který byl nalezen v Radotínském potoce, v Bavorských Alpách a v jedné z lokalit v Bádensku-Württembersku a pravděpodobně i v Lucembursku (haplotyp APT Rouderbaach).

Novým vzácným haplotypem nalezeným v této práci mimo povodí Labe je haplotyp WIE10 nalezený u jednoho jedince z lokality Wielandsbach (Bádensko-Württembersko) a haplotyp SKV2 nalezený u 2 jedinců z potoka Vydrice (Malé Karpaty).

Tabulka 4: Haplotypy raka kamenáče ve střední Evropě (pozice odpovídají studii Schubarta a Hubera 2006. Symbol N odpovídá skutečnosti, že haplotypy APT-Breisgau a APT-Rouderbaach jsou kratší, ale ve své délce jsou totožné s haplotypy o řádek nad nimi)

Haplotyp	N sekvencí	Nukleotidová pozice									Lokalita			
		24	26	193	302	435	103	226	340	547	N lokalit	Lokalita	Povodí	Stát
ht1	216	C	T	C	A	C	C	C	C	A	43		Labe, Dunaj, Rýn	CZ, DE, AT, CH
ht1(APT-Breisgau)	3	N	N	C	A	C	C	C	C	A	3	Schlierbaach, Gailbach, Freiburg	Rýn	FR, FR, DE
ht2	11	T	T	C	A	C	C	C	C	A	4, 1	Allgäu, Haldensee	Dunaj	DE, AT
ht3	7	C	T	T	A	C	C	C	C	A	1, 1, 2	Radotínský potok, Bottwar, Allgäu	Labe, Rýn, Dunaj	CZ, DE, DE
ht3(APT-Rouderbaach)	1	N	N	T	A	C	C	C	C	Q	1	Rouderbaach	Rýn	LU
Ht4	1	T	T	T	A	C	C	C	C	A	1	Allgäu: Auerberg	Dunaj	DE
ht5	1	C	T	C	A	T	C	C	C	A	1	Wienerwald	Dunaj	AT
WIE10	1	C	C	C	A	C	C	C	C	A	1	Wielendsbach	Rýn	DE
ZBI2M	1	C	T	C	G	C	C	C	C	A	1	Zbirožský potok	Labe	CZ
SKV2	2	C	T	C	A	C	T	C	C	A	1	Vydrica	Dunaj	SK
Logatec	5	C	T	C	A	C	C	T	T	G	1	Luční potok v Podkrkonoší	Labe	CZ

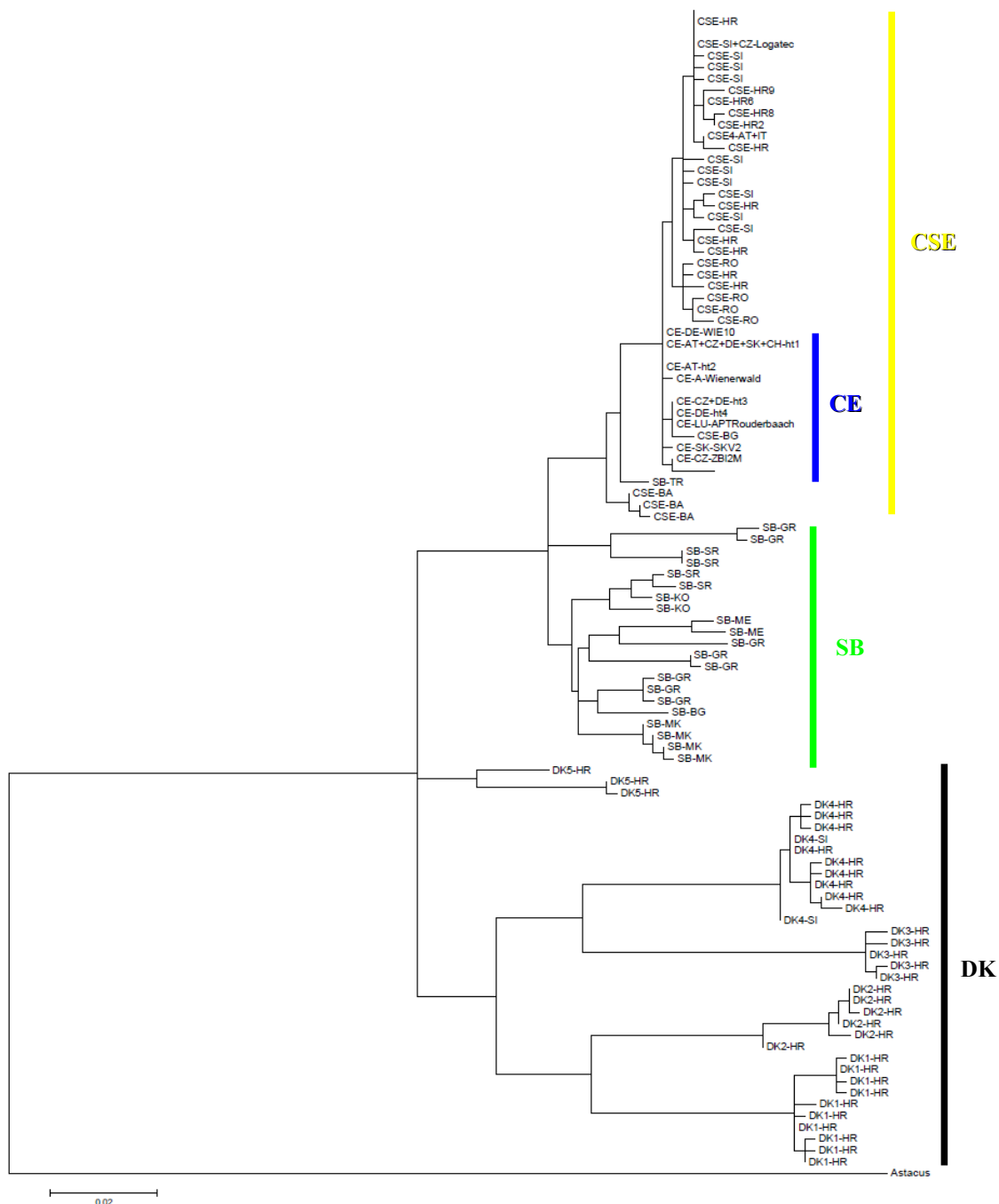


Obrázek 2: Haplotypová síť populací raka kamenáče v povodí Labe. U každého haplotypu je uveden jeho kód (stejný jako v tabulce 4), počet lokalit, na kterých byl nalezen a v případě vzácných haplotypů také název jejich lokality. Červené body na spojnicích haplotypů představují substituce, čísla u nich udávají pozici substituce odpovídajícího pozici v sekvencích publikovaných Schubartem a Huberem (2006).

4.1.3 Genetická diverzita raka kamenáče v kontextu celého areálu

Pro vyjádření genetické diverzity ve střední Evropě v kontextu celého areálu byl použit fylogenetický strom haplotypů z celého areálu. Soubor použitý pro popis diverzity na sever od Alp byl rozšířen o haplotypy ze zbytku areálu ze studie Trontelja a kol. (2005) a Klobučara a kol. (2013). Celkem tak vznikl soubor 94 haplotypů raka kamenáče z celého areálu, ve kterém bylo nalezeno sedm skupin haplotypů. Pět skupin vysoce divergentních haplotypů pochází z Dinárského krasu (DK1-5). Další výraznou skupinou je parařyletická skupina haplotypů z jižního Balkánu (SB). Největší areál má skupina CSE, která zahrnuje holotypy ze střední a jihovýchodní Evropy, součástí této skupiny jsou i haplotypy z části areálu na sever od Alp, které tvoří samostatnou podskupinu CE. Rozdělení vlastních haplotypů raka kamenáče na skupinu SB a CSE, která zahrnuje i skupinu CE je vidět na haplotypové síti 66 haplotyp

Genetické divergence mezi osmi skupin haplotypů jsou ukázány v tabulce 5. V tabulce je osm skupin místo sedmi, protože skupina CSE je rozdělena na skupinu CE a SE zahrnující holotypy skupiny CSE, které pochází z oblasti na jih od Alp.

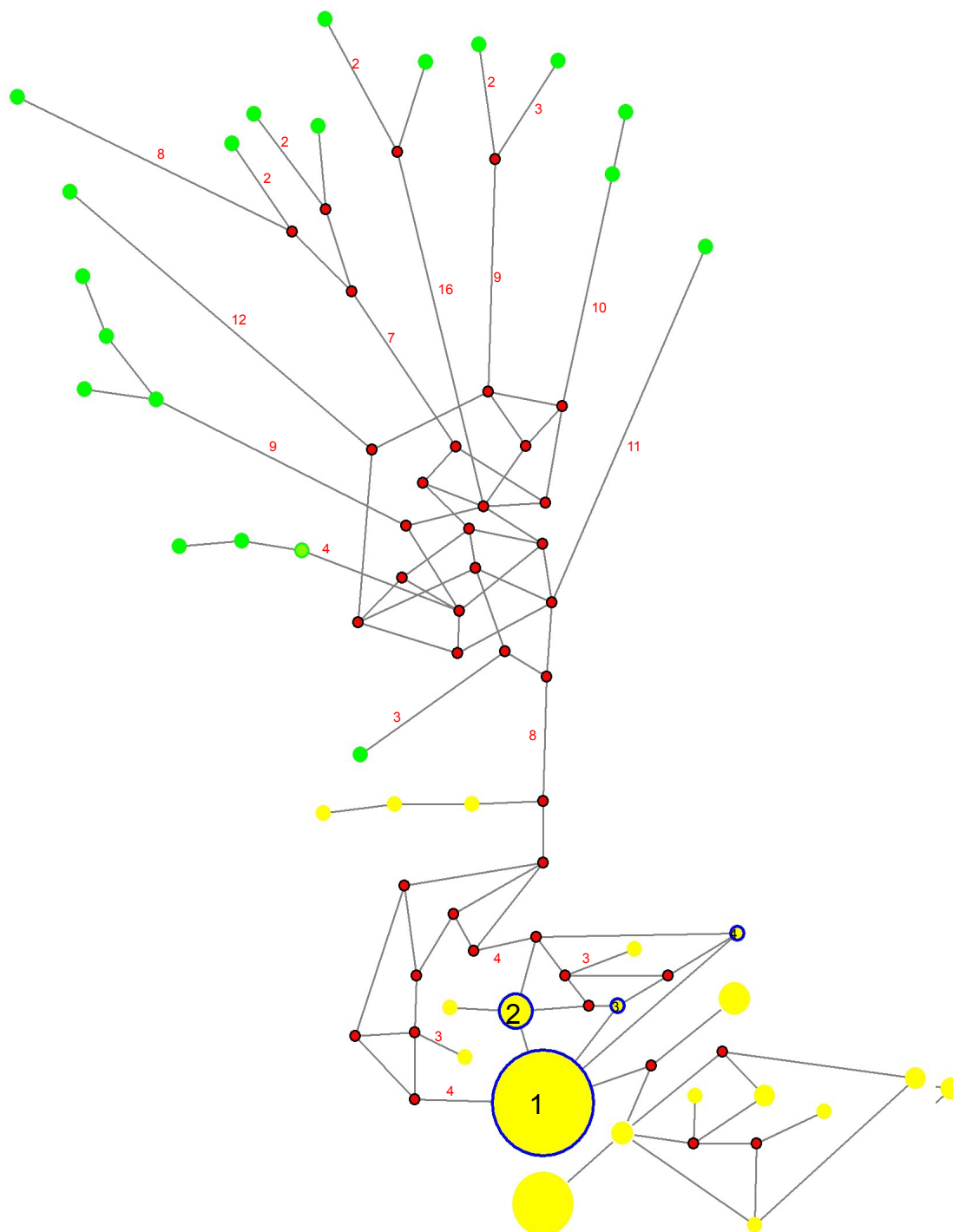


Obrázek 3: Fylogram všech holotypů raka kamenáče odvozený metodou maximální pravděpodobnosti. Jednotlivé holotypy jsou vyjádřeny kombinací zkratky holotypové skupiny, státu nebo států, kde byl holotyp nalezen. V případě holotypů z oblasti na sever od Alp jsou navíc uvedeny ještě názvy holotypů stejné jako v textu. Zkratky holotypových skupin: DK1-5 dinárské holotypové skupiny, SB jižní Balkán, CSE střední a jihovýchodní Evropa, CE střední Evropa na sever od Alp.

Zkratky států: AT - Rakousko; BA – Bosna a Hercegovina, BG - Bulharsko; CH - Švýcarsko; DE - Německo; FR - Francie; GR - Řecko; HR - Chorvatsko; IT - Itálie; LU - Lucemburk; ME – Černá hora; MK - Makedonie; RO - Rumunsko; SR - srbsko; SI - Slovinsko; TR - Turecko.

Tabulka 5: divergence skupin haplotypů. Názvy haplotypových skupin jsou stejné jako v textu.

	CE	SE	SB	DK1	DK2	DK3	DK4	DK5
CE								
SE	0,008							
SB	0,036	0,039						
DK1	0,073	0,074	0,076					
DK2	0,070	0,069	0,072	0,068				
DK3	0,072	0,076	0,075	0,076	0,077			
DK4	0,078	0,081	0,080	0,068	0,072	0,065		
DK5	0,056	0,059	0,057	0,075	0,073	0,077	0,077	



Obrázek 4: Síť haplotypů vytvořená metodou Median Joining se Star Contraction vlastního druhu raka kamenáče. Červená kola jsou haplotypy předpokládaných předků. Žlutá kola jsou haplotypy ze skupiny CSE. Modře označené jsou haplotypy z oblasti na sever od Alp. Zeleně jsou označeny haplotypy ze skupiny SB. Délky spojnic haplotypů neodpovídají počtu mutačních kroků. Počet mutací vyšší než jedna je uveden červenými čísly u odpovídajících spojnic. Velikost haplotypů odpovídá počtu lokalit, na kterých byly nalezeny. Větší kruhy ve skupině CSE odpovídají skupinám blízkce příbuzných haplotypů. Čísly jsou označeny skupiny haplotypů obsahující haplotypy nalezené v oblasti na sever od Alp: Skupina 1: ht1, ht2, ATP-Breisgau, Wienerwald, skupina 2: ht3, ht4, ATP-Rouderbaach, skupina 3: ZBI2M, skupina 4: SKV2, skupina 5: zahrnuje 12 haplotypů z oblasti na jihovýchod od Alp, převážně ze Slovinska, mezi které patří i haplotyp Logatec, který byl nalezen i v Lučním potoce v Podkrkonoší.

4.2 Amplifikace a sekvence dlouhého úseku genu COI

Výsledkem sekvenace dlouhého úseku genu COI pomocí primerů COI-F a CoxREV bylo získání 11 sekvencí o délce 1120 bp. Tyto sekvence se v úseku 617 bp, který by měl odpovídat krátkému úseku genu COI získaného ze stejných jedinců od tohoto úseku lišily a jejich přepis do sekvence AMK obsahoval stopkodóny. Jedna ze sekvencí získaná pomocí primerů COI-F a CoxREV, odlišnosti v úseku odpovídajícímu krátkému úseku genu COI a překlad do sekvence AMK jsou vidět na obrázku 5. Tato sekvence s největší pravděpodobností náleží jadernému pseudogenu (viz diskuze). Získaná sekvence pseudogenu se od sekvence haplotypu ht1 lišila 12,5% bazí. Pomocí nástroje BLAST vyšla jako nejpodobnější (87%) k této sekvenci sekvence raka bělonohého (Matallanas a kol. 2011).

Obrázek 5: Nukleotidová sekvence získaná pomocí primerů COI-F a CoxREV a její překlad na sekvenci aminokyselin.

Sekvence nukleotidů (podtržený je úsek, který v alignmentu odpovídá standardnímu krátkému úseku genu COI, tučně a bez pozadí jsou uvedeny nukleotidy lišící se od sekvence získané pomocí primerů pro krátký fragment):

IATTTTGGAACTTGATCGGGTAAGTGGGGACCTCTTAAGAAATTAATCCGTGTGAACTTGGTCAACCA
GGAAAGTTTAATTGGGGACGATCAAAATTAATAATGTAGTAGTAACCGCCATCCCTTTGTATAAATTTTTTTTATA
GIAATACTAATTAATTTGGGGGTTTGGAAATGATAGTTCCTTAAATATTAGGAGCCCCGATATGGCTTT
TCCTCGTATAAATAATAAAGATTTTGATTAATCCAAATTTCTTAACTTATTATAAATAGGGGAATAGTAGA
GAGGGGAGTGGGAACAGGATGGACCTGTATATCCITCCCTTAGCATAAAGCTATTGCTCATGCAGGAGCTTCTGT
TGATTCAGGAATTTTTCACCTCATTACCAAGGGGTTCTTCAATTTTAGGGCGGTAAATTAATCGGGTAAT
GTGGGGACCTCTTATAACATGGCTAATAATACTAGTAGAGTAGGAATAACTAATAGATCGTATGCCCTTTTT
GTTTGATCTGTATTATACAGCGAGTCTTTTACTTTATCTTACCTGTACIAGCAGGTGCTATTACIATACTA
TTAAACAGACCGTAATTTAAATCTTAATTTTTTATCCCTGCTGGAGGAGCCGACCCGATTTTATCAACATT
ATTTTGAATTTTTGGCCACCCAGAGGTTAATTTAATTTTACCTGCGTTGGTATGGIATCTCATATTGTTC
TTAGGAGTCAGGGAAAAGAAAGCCCTTTGGTACTTATAGGGATGATTATGCTATGATTCCATTGGTGTTTA
GGATTGTGTGATTGAGCTCATCATATGTTACGGTAGGTATAGACGATAGATACTCGAGCATATTTTACTTCTCC
CACAAATAATATTGCCGTACCAAAGGGGATTAAGATTTTATGGTGATTAGGACTCCACCAAGGGTACTCAAA
TAAATAAGTCCCTCTCTATTATGAGTTTACGGTTTATTATTAATTACCCGATGGGGTTTGAAGGGAGTAGTT
TTAGCTAATCTCTATTGACATTATTTACATGAACTTATTATGTGGTACCTCACTTCCATTACGTTCTTCAA
TGGGAGCAGTATTGGGTTT

Překlad do sekvence aminokyselin (symbol * značí stopkodón):

FIFGTWAGMVGTSLSMIIRVELGQPGSLIGDDQIYNVVVTAYAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMA
FPRMNNMSFWLLQFSLTLLNSGMVESGVGTGWTVYPLA***A**IAHAGASVDSGIFSLHLAGVSSILGAVNYMT
MAINMRSVGMTMDRMPLFVWSVFITAVLLLLSLPVLAGAITMLLTDRNLNT***F**FPAGGGDPILYQHLFWFFGH
PEVYILILPAFGMVSHIVA***E**SGKEEAFGTLGMIYAMIPIGVLGFVDWAHHMFTVGMDVDTRAYFTSATMIIAVPT
GIKIFSWLGLHQGYSN***L*****S**LSIMSFSFIIMFTVGGLTGVVLANSIDILHDTYYVVAHFHYVLSMGA

Použití dvojice primerů COI-F a Scylla při amplifikaci dlouhého úseku genu COI vedlo k získání dvou fragmentů, které byly odděleny pomocí gelové extrakce. Pro delší fragment odpovídající na gelu přibližně 1100 bp se mi podařilo získat 2 identické sekvence (ze dvou vzorků patřících podle krátkého úseku genu COI k haplotypu ht1) o délce 502 bp. Překlad do sekvence AMK obsahoval několik stopkodónů a alignement se sekvencí ht1 obsahoval několik mezer. Na rozdíl od sekvencí získaných pomocí primerů COI-F a CoxREV, je u sekvencí získaných pomocí primerů COI-F a Scylla těžké určit zda jde o pseudogen. Tato sekvence se lišila 55% od sekvence haplotypu ht1. Pomocí nástroje BLAST nebyly nalezeny žádné podobné sekvence. Při hledání vzdáleně podobných sekvencí byla ve dvou krátkých úsecích nalezena podobnost s mitochondriálními geny jiných organismů. Posledních 15 bp bezprostředně předcházejících primeru Scylla bylo identických s částí sekvence genu COI kraba *Scylla paramosa* (popis druhu). Úsek mezi 35 a 77 bp byl z 86% totožný s částí sekvence genu CYTB kvasinky *Williopsis makrii* (autor popisu).

Od kratšího fragmentu, který měl na gelu délku odpovídající přibližně 500 bp se podařilo získat 4 identické sekvence (4 vzorky osekvenované náležející podle krátkého úseku genu COI k haplotypu ht1) o délce 339 bp. Překlad těchto sekvencí do AMK obsahoval opět stopkodóny a v alignmentu s krátkým úsekem genu COI obsahoval velké množství mezer (274 mezer rozdělených do několika velkých skupin). Z délky této sekvence je vzhledem k použitým primerům zřejmé, že nejde o sekvence genu COI, ale nelze ani určit zda jde o pseudogen.

Z výše uvedených důvodů je pochopitelné, že žádná ze sekvencí získaných pomocí primerů pro dlouhý úsek genu COI nebyla použita pro popis genetické diverzity raka kamenáče.

5 Diskuze

5.1 Genetická diverzita raka kamenáče

5.1.1 Původ populací raka kamenáče v povodí Labe

Klíčovým cílem celé studie zaměřené na analýzu variability COI v populacích v povodí Labe bylo otestovat, zda genetická data mohou podpořit či vyvrátit hypotézu, že rak kamenáč je v povodí Labe původním druhem. V pracích více autorů zabývajících se rozšířením evropských raků se objevuje názor, že rak kamenáč je v povodí Labe nepůvodní (například Machino a Füreder, 2005; Machino a Holdich, 2006, Holdich a kol. 2009b). Tento předpoklad byl ve své době logický vzhledem k tomu, že ještě nedávno byl rak kamenáč v povodí Labe považován za téměř vymizelý druh s velmi roztržštěným areálem. Jeho výskyt byl v literatuře potvrzen jen na pěti lokalitách. Těmito lokalitami byly potok Míza, Úpořský

potok, potok Zubřina, dvě lokality na potoce Klabava a Luční potok v Podkrkonoší (Kozák a kol. 2002). Vyjmenované lokality patří mezi ty, ze kterých pochází i naše vzorky, takže jsou vidět na obrázku 6. V posledních deseti letech ale byly potvrzeny mnohé další populace (Fischer a kol. 2004, Štambergová a kol. 2009, Vlach a kol. 2009). V české části povodí Labe je tak známo minimálně 45 lokalit raka kamenáče (Štambergová a kol. 2009). Rak kamenáč má tedy podle posledních údajů centrum výskytu v České Republice ve středních a západních Čechách (viz. úvod). K těmto lokalitám je potřeba připočítat i nedávno objevenou populaci raka kamenáče v Sasku v blízkosti Drážďan (Martin a kol. 2008). Je tedy vidět, že rak kamenáč má v povodí Labe poměrně velké a v mnoha oblastech relativně spojitě rozšíření, což nepodporuje scénář několika nedávných lokálních introdukcí člověkem.

Obrázek 6: Mapa známých lokalit raka kamenáče v povodí Labe podle průzkumu probíhajícího v sezóně 2000. Mapa byla vytvořena podle Kozáka a kol. (2002).



Ve všech populacích v povodí Labe (s výjimkou Lučního potoka z Podkrkonoší) dominuje haplotyp ht1, který je dominantní i v dalších střeoevropských povodích s výskytem tohoto druhu (Dunaj, Rýn). Přítomnost tohoto haplotypu znamená jen tolik, že příslušné populace nemají původ ze vzdálenějších oblastí, ale nepomáhá nám rozhodnout se, zda jsou důsledkem přirozeného šíření nebo lidské introdukce se sousedních povodí. S řešením otázky původu našich populací, ale pomáhá výskyt vzácných haplotypů. V případě introdukce z povodí Dunaje by se v povodí Labe neměly vyskytovat žádné vzácné haplotypy v důsledku efektu zakladatele. V povodí Labe byly ale nalezeny dva vzácné haplotypy blízce příbuzné haplotypu ht1. Jeden z těchto haplotypů se vyskytuje i na několika málo lokalitách v povodí Dunaje v jižním Německu (Schubart a Huber 2006). V případě, že byly české populace introdukovány z oblasti, kde se vyskytuje společně haplotyp ht1 a ht3, by měl být

tento haplotyp v povodí Labe relativně častější než v povodí Dunaje, což nebylo potvrzeno (byl nalezen jen na jedné lokalitě u tří jedinců z Radotínského potoka). Druhý vzácný haplotyp byl nalezen jen u dvou jedinců ze Zbirožského potoka a je pro povodí Labe unikátní. Nález haplotypu, který je zatím pro povodí Labe unikátní, podpruje hypotézu přirozeného původu raka kamenáče v povodí Labe.

Výskyt unikátního haplotypu raka kamenáče v povodí Labe nemusí znamenat, že je zde původním druhem. Filipová a kol. (2011) našli u několika jedinců invazního raka pruhovaného *Orconectes limosus* v jedné populaci v povodí Labe vzácný COI haplotyp lišící se jednou bodovou mutací od dominantního haplotypu. Dominantní haplotyp byl nalezen i u všech ostatních evropských populací a byl i jedním ze dvou nejrozšířenějších haplotypů v původním areálu (Filipová a kol. 2011). Evropské populace raka pruhovaného jsou pravděpodobně důsledkem jediné introdukce několika desítek jedinců na konci 19. století (Filipová a kol. 2011). Haplotypová diverzita je u raka pruhovaného oproti většině původního areálu značně ochuzená (Filipová a kol. 2011), zatímco u raka kamenáče v povodí Labe se téměř neliší od jiných částí střední Evropy na sever od Alp.

Lepšímu zvážení původu českých populací z jižního Německa by mohlo pomoci porovnání rozložení unikátních haplotypů v povodí Labe a v povodích Dunaje a Rýna v jižním Německu (přesněji: Bavorsko, Bádensko-Würtembersko a sousedící části Alpských států). Takto definované oblasti mají dohromady šest haplotypů (ht1, ht2, ht3, ht4, ZBI2M, WIE10). Dva haplotypy jsou sdílené mezi porovnávanými oblastmi (ht1, ht3). V jižní skupině populací jsou tři unikátní haplotypy (ht2, ht4, WIE10) a v povodí Labe jeden (ZBI2M). Tento poměr unikátních haplotypů vypadá velmi podobně vezme-li se v potaz větší areál jižní skupiny, je však otázkou zda by větší počet vzorků na populaci nevedl k nálezu více vzácných haplotypů i v Německu. V povodí Labe vychází na jednu lokalitu přibližně devět raků kamenáčů zatímco ve druhé skupině populací jsou to jen 1-2 jedinci na lokalitu.

Další otázkou je, kde mohl rak kamenáč překonat rozvodí při kolonizaci povodí Labe. Autoři Machino a Holdich (2006) navrhovali ve své práci dvě možné cesty osídlení povodí Labe rakem kamenáčem. Jako první z těchto cest je udáváno propojení povodí Labe a Dunaje v minulosti. Povodí Labe a Dunaje byly naposledy trvale propojeny v třetihorách (Chlupáč a kol. 2002), ale předpokládá se, že v průběhu pleistocénu docházelo opakovaně ke krátkodobým propojením horních toků Dunaje, Labe a Mohanu (Hantke 1993 podle Hänfling a kol. 2002). Pokud by byl rak kamenáč přítomen v povodí Labe (a na sever od Alp obecně) již od třetihor, musel by mít podstatně větší genetickou variabilitu, než jaká zde byla nalezena. Mohl však také kolonizovat povodí Labe v jednom ze čtvrtohorních interglaciálů jak je předpokládáno u vranky obecné *Cottus gobio* (Englbrecht a kol. 2000, Hänfling a kol.

2002).

Kolonizace povodí Labe v interglaciálu předpokládá existenci lokálního glaciálního refugia. Takové refugium je navrženo v povodí Labe pro vranku obecnou (Hänfling a kol. 2002), která je chladnomilným druhem s velmi podobnými ekologickými nároky jako rak kamenáč (o ekologických nárocích vranky píší Tomlinson a Perrow 2000). Přesná poloha tohoto refugia pro vranku sice není známa (Hänfling a kol. 2002), ale lze hypotetizovat, že rak kamenáč mohl teoreticky takové refugium s vrankou sdílet. V případě existence severního glaciálního refugia pro raka kamenáče by se nicméně dal očekávat v povodí Labe výskyt divergentnějších haplotypů, zatímco současný stav podporuje spíše scénář jedné vlny postglaciální kolonizace oblastí na sever od Alp (Schubart a Huber 2006, Trontelj a kol. 2005).

Druhá cesta kolonizace Labe navržená Machinem a Holdichem (2006) vede řekou Ohří. Do horních toků povodí Ohře v Německu se rak kamenáč mohl dostat podle Machina a Holdicha (2006) překonáním rozvodí se sousedícími horními toky Dunaje a Rýna. V případě, že by rak kamenáč tuto kolonizační cestu použil, dalo by se očekávat, že se nějaké populace dochovaly i v povodí Ohře, kde však není výskyt raka kamenáče znám (Štambergová a kol. 2009).

Třetí kolonizační cestou s ohledem na současný výskyt raka kamenáče v povodí Labe, je překonání hranic povodí v oblasti Českého lesa a následná kolonizace povodí Berounky a Labe v holocénu (A. Petrusek, os. sdělení). Centrem současného rozšíření jsou západní Čechy, kde se rak kamenáč vyskytuje v tocích v těsné blízkosti s hranicemi s Německem. V oblasti českého lesa se nachází blízko u sebe potoky obývané raky kamenáčem patřící k povodí Labe a Dunaje. Konkrétně Medvědí a Novosedlecký potok patří k povodí Dunaje a nachází se v těsné blízkosti toků Zubřina a Radbuza, které patří do povodí Labe. V takové oblasti mohl rak kamenáč překonat hranice rozvodí přechodem souše mezi dvěma blízkými toky nebo za pomoci některých z přirozených vektorů.

Z tohoto popisu raka kamenáče jakožto původního druhu v povodí Labe se vymyká populace z Lučního potoka v Podkrkonoší. Tato populace je prostorově oddělená od zbytku populací raka kamenáče (viz obr. 1) a navíc se odlišuje i morfometricky (P. Vlach, nepublikovaná data dle Petrusek 2013). Výlučnost populace z Podkrkonoší byla potvrzena i geneticky. U všech studovaných jedinců z tohoto potoka byl nalezen stejný haplotyp Logatec, který byl nalezen ve středním Slovinsku. V tomto případě je mnohem pravděpodobnější než přirozené šíření vysazení lidmi. Přesná doba, kdy k této introdukci došlo, není známa.

5.1.2 **Fylogeografie raka kamenáče: povodí Labe ve vztahu ke zbytku areálu**

Tři ze čtyř haplotypů nalezených v povodí Labe tvoří společně s dalšími čtyřmi haplotypy z povodí Dunaje a Rýna na sever od Alp skupinu haplotypů, která svou pozicí v haplotypové síti (obr. 4) a fylogenetickém stromě (obr. 3) odpovídá skupině haplotypů z horního Rýna popsané v práci Trontelja a kol. (2005). Středoevropské haplotypy jsou součástí širší skupiny haplotypů, která navíc zahrnuje haplotypy ze Slovinska a jihovýchodu Alp (Trontelj a kol. 2005, Klobučar a kol. 2013). Mezi slovinské haplotypy patří i haplotyp Logatec, nalezený v populaci z Podkrkonoší. Skupina haplotypů střední Evropy, jihovýchodních Alp a Slovinska vznikla diverzifikací jedné ze šesti haplotypových linií z balkánského centra diverzity vlastního druhu raka kamenáče, která se v průběhu pleistocénu šířila z Balkánu (Trontelj a kol. 2005, Klobučar a kol. 2013). Tato haplotypová linie se podle odhadu Trontelje a kol. (2005) oddělila od sesterské turecké linie před 2 miliony let v pozdním Pliocénu a v průběhu pleistocénu se rozšířila do svého současného areálu. Oblast jihovýchodních Alp a Slovinska byla pravděpodobně kolonizována dříve než oblast severně od Alp a v této oblasti jsou také předpokládána glaciální mikrorefugia, která umožnila přežití a diverzifikaci haplotypů lokálních populací (v porovnání s haplotypovou diverzitou na sever od Alp) (Trontelj a kol. 2005). Na sever od Alp se rak kamenáč dostal pravděpodobně až po skončení poslední doby ledové, čemuž odpovídá i nízká haplotypová diverzita (Trontelj a kol. 2005, Schubart a Huber 2006, Klobučar a kol. 2013, tato práce). Předpokladu rychlé kolonizace oblasti na sever od Alp po skončení poslední doby ledové odpovídá i uspořádání haplotypové sítě středoevropské oblasti, která má hvězdovitý tvar. Taková topologie u haplotypové sítě odpovídá populační expanzi (Avice 2000).

K předcházející části je dále třeba zmínit, že Klobučar a kol (2013) diskutovali výsledky Trontelja a kol. (2005), o tom že populace severně od Alp prošly populační expanzí, což odpovídá i mým výsledkům. Klobučar a kol. (2013) pro tuto diskuzi ovšem použili vztahy mezi haplotypy z oblasti na sever od Alp i z jihovýchodu Alp a Slovinska a není tedy překvapivé (vzhledem k výše popsanému), že pro takovou skupinu haplotypů nebyla v jejich práci populační expanze prokázána.

Balkánská skupina haplotypů je odvozená od nejjižnější ze čtyř skupin vysoce divergentních haplotypů raka kamenáče (Klobučar a kol. 2013). Po oddělení od společného předka s rakem bělonohým před 8-12 miliony let (Trontelj a kol. 2013) nebo 8-17 (Klobučar a kol. 2013) byl areál raka kamenáče omezen pouze na oblast dnešního Dinárského krasu, v rámci které se v průběhu třetihor šířil od severu na jih (Klobučar a kol. 2013). Dinárské populace mohly přežít čtvrtohorní cykly glaciací v předpokládaných lokálních mikrorefugiích (Klobučar a kol. 2013). V přepočtu na plochu má relativně malá oblast Dinárského krasu

nejvyšší haplotypovou diverzitu a předpokládá se, že další výzkum v této oblasti povede pravděpodobně k přijetí raka kamenáče jako druhového komplexu. Výsledky práce Klobučara a kol. (2013) jsou detailněji diskutovány v úvodní kapitole o fylogeografii raka kamenáče (Kapitola 1.2.4). Unikátnost dinárských skupin je vidět na míře jejich divergence od ostatních skupin (viz tabulka 5). Zjištěné hodnoty divergencí mezi haplotypy se velmi podobají divergencím vypočítaným Klobučarem a kol. (2013).

5.1.3 Porovnání zjištěných údajů o genetické diverzitě a fylogeografii raka kamenáče s jinými druhy

Srovnání zjištěných údajů o genetické diverzitě raka kamenáče s jinými druhy může pomoci lépe ukázat, nakolik běžné jsou popsány výsledky v rámci celého areálu i v rámci střední Evropy. Nejvhodnějšími druhy pro takové srovnání by měly mít podobnou ekologii a disperzní schopnosti. Tyto požadavky nejnázve splňuje druhový komplex raka bělonohého a rak říční. Oba tyto druhy mají podobné, i když širší ekologické nároky než rak kamenáč (Maguire a Gottstein-Matočec 2004) a mají větší areály (Holdich 2002b).

Jako první mezidruhové srovnání uvádím sesterský druhový komplex raka kamenáče, raka bělonohého. Přestože je areál raka bělonohého omezen převážně na západní a jižní Evropu a s areálem raka kamenáče se téměř nepřekrývá (Holdich 2002b), lze u těchto druhů najít společné prvky rozložení genetické diverzity s klasickými jižními refugii. Centrum diverzity raka bělonohého se nachází na poloostrově Istrie (Trontelj a kol. 2005), který se nalézá v oblasti severozápadního Balkánu přibližně 250 km severozápadě od Dinárského krasu, který je centrem diverzity raka kamenáče (předpokládaného druhového komplexu nikoli vlastního druhu) (Klobučar a kol. 2013). U raka kamenáče (Trontelj a kol. 2005, Schubart a Huber 2006) i raka bělonohého se předpokládají další mikrorefugia v alpské oblasti (Trontelj a kol. 2005, Stefani a kol. 2011). U obou těchto taxonů byla v oblasti Alp nalezena vyšší diverzita haplotypů, u raka kamenáče na severu Alp (Schubart a Huber 2006) a u raka bělonohého na obou stranách Alp (Largiadèr a kol. 2000, Trontelj a kol. 2005). U raka bělonohého se navíc předpokládají i další glaciální refugia (Gouin a kol. 2006, Cataudella a kol. 2010, Fratini a kol. 2005, Zaccara a kol. 2005) odpovídající jeho většímu areálu. Rak bělonohý má stejně jako rak kamenáč sníženou genetickou diverzitu v oblastech na severu od Alp (Grandjean a Souty-Grosset 2000). Rak bělonohý je mnohem více studovaný než rak kamenáč a výsledky těchto studií nabízí velké množství témat, které ale nejsou pro účely mé práce důležité (detailněji jsem je rozebíral ve své bakalářské práci, Pešek 2011).

Popsaná genetická diverzita raka kamenáče v povodí Labe je v rámci Evropy nejpodobnější údajům o genetické diverzitě raka bělonohého v Anglii. Povodí Labe

představuje izolovanou okrajovou část areálu raka kamenáče, stejně jako Britské ostrovy jsou izolovanou částí areálu raka bělonohého. Obě tyto oblasti leží v části Evropy, která byla výrazně ovlivněna pleistocénními cykly zalednění (Hewitt 1996). Anglie byla pro raky neobyvatelná, ale v povodí Labe je diskutováno možné glaciální refugium chladnomilných vodních druhů (Englbrecht a kol. 2000) (viz kapitola 5.1.1). V obou těchto oblastech byla také diskutována pravděpodobnost či nepravděpodobnost přirozeného původu populací raků rodu *Austropotamobius* (Holdich a kol. 2009a,b).

Původ populací raka bělonohého v Anglii je stále předmětem diskuze (Kouba a kol. 2013), i když v recentních studiích se raku bělonohém již převážně píše jako o původním druhu jižní Anglie (Holdich a kol. 2009a,b, Almeida a v tisku). Pro raka kamenáče existuje více argumentů pro jeho přirozený původ v povodí Labe (viz kapitola 5.1.1). Většina studií zabývajících se genetickou diverzitou raka bělonohého v Anglii pracovala s variabilitou mitochondriálního genomu získanou pomocí metody RFLP (Grandjean 1997a, Grandjean a kol. 1997b, Grandjean a Souty-Grosset 2000) na rozdíl od raka kamenáče, u kterého byla zatím studovány pouze variabilita části sekvence mitochondriálního genu COI, ale závěry z obou oblastí jsou velmi podobné. V obou oblastech byla zaznamenána velmi nízká genetická variabilita a sdílení dominantního haplotypu se sousedními povodími. U anglických populací byl podle Grandjeana a Souty-Grossetové (2000) nalezen pouze jeden haplotyp, který je zároveň nejpočetnějším haplotypem atlantské linie *A. pallipes pallipes*, vyskytující se kromě Anglie a Irska i v atlantských povodích Francie (Grandjean a Souty-Grosset 2000, Gouin a kol. 2006). Předpokládá se, že rak bělonohý mohl osídlit Anglii přirozenou migrací díky propojení anglických a francouzských povodí na konci poslední doby ledové, kdy byla ještě Anglie spojena s evropským kontinentem pevninským mostem v oblasti dnešního průlivu La Manche (Grandjean 1997b). Dominantní haplotyp ht1 z povodí Labe je nejrozšířenějším haplotypem i ve studovaných částech středoevropských povodí Dunaje a Rýna. Jako je v povodí Labe s velkou pravděpodobností introdukovanou populace z Podkrkonoší, tak jsou v Anglii prokazatelně introdukované dvě skotské populace (Holdich and Reeve 1991). Na britských ostrovech se předpokládá, že na šíření raků ve středověku se výrazně podílely mnišské řády, které vysazovali raky jako vhodnou náhradu masa v obdobích náboženských půstů, ovšem v případě mnichů šlo většinou o přenášení na malé vzdálenosti v rámci Anglie (Holdich a kol. 2009), z Francie do Irska (Gouin a kol. 2003) a možná i z Francie do Anglie (Holdich a kol. 2009a). Oproti tomu kamenáči z Podkrkonoší pravděpodobně podstoupili s pomocí člověka nepřerušenu cestu až ze Slovinska vzdáleného přibližně 500 km.

Souhrnně lze tedy říci, že podobně nízká genetická diverzita u raka bělonohého v Anglii a u raka kamenáče v povodí Labe lze vysvětlit relativně rychlou přirozenou kolonizací těchto

oblastí na konci poslední doby ledové ze sousedních povodí. V obou případech sehrály svou roli i introdukce raků, ale většinu populací zřejmě lze považovat za původní. Rozdílem je, že v povodí Labe byly na rozdíl od Anglie nalezeny oproti sousedním povodím jeden vzácný haplotyp, které nebyl jinde nalezen.

V případě Britských ostrovů se nelze nezmínit o Irsku, kde se rovněž rak bělonohý vyskytuje, ale jde zde o druh nepůvodní. To je podloženo skutečností, že stejně jako zbytek Britských ostrovů bylo Irsko během poslední doby ledové pro raky neobyvatelné a krátce po jejím skončení bylo od Anglie odděleno mořem. Irské populace zkoumané pomocí RFLP metody nevykázaly žádnou variabilitu a byly identické s jedním z haplotypů ze severní Francie (Gouin a kol. 2003). Proto byly dále studovány pomocí metody RAPD využívající variabilnější jaderné markery. Použití jaderných markerů umožnilo zrekonstruovat přibližný severojižní průběh kolonizace Irska rakem bělonohým po vysazení lidmi na jihu ostrova (Gouin a kol. 2003). Tato studie potvrzuje vhodnost použití jaderných markerů v případě oblastí s populacemi s nízkou variabilitou mitochondriálního DNA, což je i povodí Labe.

Druhým račím druhem, se kterým lze částečně porovnat raka kamenáče je rak říční. Pro tento druh vyšla zatím jen jedna práce srovnávající jeho genetickou variabilitu na většině přirozeného areálu (Schrimpf a kol. 2011), je to také jediná práce, porovnatelná s mými výsledky. Schrimpf a kol. (2011) předpokládají, že hlavním glaciálním refugiem raka říčního je Balkánský poloostrov, který jako hlavní glaciální refugium a centrum šíření využil i vlastní druh raka kamenáče. Jedna z haplotypových linií raka říčního kolonizovala střední Evropu povodím Dunaje stejně jako rak kamenáč (Schrimpf a kol. 2011). U severních populací raka říčního byla nalezena snížená haplotypová diverzita, která je zdůvodněna post-glaciální rekolonizací nebo lidskými introdukcemi (Schrimpf a kol. 2011) podobně jako u raka kamenáče. U raka říčního byl potvrzen větší vliv introdukcí, který se odráží v občasném výskytu haplotypů mimo povodí, ve kterém převažují (Schrimpf a kol. 2011), a samozřejmě také ve výskytudruhu i mimo jeho areál v Anglii (Holdich 2002b) a na severu Skandinávie (Edsman a kol. 2002). V české části povodí Labe byl nalezen jeden dominantní haplotyp vyskytující se ve většině studované oblasti a jeden vzácný haplotyp, který byl nalezen i na jedné lokalitě v povodí Dunaje v Rakousku (Schrimpf a kol. 2011). Je ale třeba dodat, že z české části povodí Labe zahrnuli Schrimpf a kol. (2011) 18 jedinců ze tří lokalit a porovnávala byla variabilita 350 bp dlouhého úseku genu COI, takže tento výsledek není zcela porovnatelný s mými výsledky.

Třetím druhem, který budu porovnávat s rakem kamenáče je vranka obecná, která byla vybrána vzhledem k tomu, že se vyskytuje ve stejných typech toků jako rak kamenáč a má podobné disperzní schopnosti (Tomlison a Perrow 2003) a na rozdíl od výše popsaných

račích druhů se u ní nepředpokládají introdukce (Engelbrecht a kol. 2000). Vranka obecná byla použita jako modelový druh rekolonizace střední Evropy po poslední době ledové Engelbrechtem a kol. (2000) v práci, která zahrnovala vzorky z celého areálu, ale byla soustředěna hlavně na oblast jižního Německa. Ve střední Evropě byla u vranky podobně jako u raka kamenáče potvrzena snížená nukleotidová diverzita pravděpodobně v důsledku zalednění. Mezi vzájemně odlišenými skupinami haplotypů střední Evropy je si nejpříbuznější skupina z povodí Labe se skupinou z povodí Mohanu a horního toku Dunaje. Naprostá většina střeoevropských haplotypů patří k nejstarší evropské haplotypové skupině vranky, která je pozůstatkem první kolonizace Evropy z moře Paratethys v období třetihor (Engelbrecht a kol. 2000, Hänfling a kol. 2002). Scénář třetihorní kolonizace střední Evropy je pro raka kamenáče značně nepravděpodobný (viz kapitola 5.1.1 o původu raka kamenáče v povodí Labe). Populace vranky dokázaly zřejmě přežít období pleistocénních glacií ve střední Evropě (Engelbrecht a kol. 2000), i když během nich došlo k významným populačním propadům projevujících se v současnosti jako snížení nukleotidové diverzity. Pro vranku bylo navrženo glaciální refugium v povodí Labe jakožto jediné možné vysvětlení rozložení genetické variability v rámci celého evropského areálu (Hänfling a kol. 2002). Engelbrecht a kol. (2000) a Hänfling a kol. (2002) vysvětlují kolonizaci povodí Labe vrankou minulým propojením povodí Dunaje a Labe, což je jedna ze dvou kolonizačních cest navržených Machinem a Holdichem (2006) pro raka kamenáče (viz kapitole 5.1.1).

5.2 Neúspěšný pokus o sekvenaci dlouhého úseku genu COI

Pokud by se podařilo úspěšně osekvenovat dlouhý úsek genu COI, mohlo by to vést u raka kamenáče k podobnému zvýšení rozlišení dat, jaké je vidět v práci Matallanse a kol. (2011), kde byl poprvé u raka bělonohého úspěšně osekvenován dlouhý úsek genu COI (1184 bp) pomocí primerů COI-F a Scylla. V sekvencích získaných ze španělských populací raka bělonohého tak byla objevena tři nová variabilní místa za koncem krátkého úseku COI, což vedlo ke zlepšení údajů o genetické variabilitě (Matallanas a kol. 2011) oproti dřívějším studiím ze stejné oblasti, ve kterých byl použit standardní úsek genu COI (Trontelj a kol. 2005, Diéguez-Urbeondo a kol. 2008). Pro porovnání jsou nejvhodnější výsledky Diégueze-Urbeonda a kol. (2008) kteří použili standardní úsek COI amplifikovaný primery COI-F a COI-R. Mezi reprezentativními populacemi z iberské části areálu raka bělonohého našli Diéguez-Urbeondo a kol. (2008) dva haplotypy. Oproti tomu Matallanas a kol. (2011) našli na podobné, ale menší sadě reprezentativních populací osm haplotypů.

Dlouhá sekvence, kterou se mi podařilo získat pomocí primerů COI-F a CoxREV má vlastnosti, podle kterých jsou rozeznávány jaderné pseudogeny mitochondriálních genů (nuclear mitochondrial DNA, NUMT). O dalších možných sekvencích podobných COI, které nejsou pseudogeny píše Baeza a Fuentes (2013). Sekvence podobné COI mohou být

důsledkem heteroplazmie (tj. výskyt více kopií mitochondriálního genomu u jednoho jedince). Konkrétně u třásněnky *Thrips tabaci* našli Frey a Frey (2004) u některých jedinců více mírně se lišících COI haplotypů. Část z těchto haplotypů neobsahovala stopkodóny a je považována za důsledek heteroplazmie (Frey a Frey 2004). Oproti tomu mé sekvence stopkodóny obsahovaly a lišily se podstatně více od standardního úseku genu COI. Další možností by bylo, že kopie mitochondriálního genu vznikla duplikací v rámci mitochondriálního genomu, to však není u koryšů až na výjimky běžné (Baeza a Fuentes 2013). Takže lze předpokládat, že COI podobné sekvence raka kamenáče jsou opravdu NUMT. Způsob rozpoznání pseudogenů souvisí s jejich podstatou. NUMT lze považovat za důsledek probíhajícího evolučního procesu přenosu mitochondriální DNA do jaderného genomu (Hazkani-Covo a Graur 2007). Tyto kopie mitochondriálních genů jsou obvykle nefunkční a mohou se v nich tudíž hromadit nepřeložitelné mutace, které by u funkčního genu vedly k jeho eliminaci. Takovými mutacemi mohou být inserce nebo delece nebo přítomnost stopkodónů, které by narušily překlad do sekvence AMK (Buhay 2009). Z výše popsaného vyplývá, že nejdůležitější kontrolou zda je sekvence funkčním genem je překlad do sekvence AMK, který musí být u správně upraveného úseku genu COI plynulý. V GenBank se nachází mnoho sekvencí podobných COI, které ale obsahují odlišnosti neslučitelné s funkčním genem. Buhayová (2009) předpokládá, že jde ve většině případů o pseudogeny. Části obsahující stopkodóny a další chyby v sekvencích, které Buhayová (2009) kontrolovala, jsou ale často umístěny u konce jinak korektních sekvencí. Může jít tedy jen o důsledek špatné manuální kontroly nesprávně přečteného konce sekvence (Filipová a kol. 2011). V případě chybných sekvencí z GenBank nejde ale v mnoha případech zjistit, zda jde opravdu o pseudogen nebo jen o špatně opravenou sekvenci. Další indicií k rozeznání pseudogenu byla jeho odlišnost od ověřených sekvencí krátkého úseku genu COI v odpovídajícím úseku. Na rozdíl od výsledků popsaných Baezou a Fuentesem (2013) moje dlouhé sekvence pseudogenu měly ve většině délky jednoznačný průběh křivek chromatogramu.

Dalším způsobem, jak lze odhalit pseudogen, je ověření genetické variability mezi sekvencemi: divergence mezi pseudogenem a mitochondriálním genem u stejného nebo příbuzného taxonu je vyšší než obvykle pozorovaná v rámci daného taxonu z důvodu hromadění mutací v pseudogenu (Buhay 2009). Možností, jak snížit riziko amplifikace pseudogenu, je použití tkáně, která obsahuje co nejvíce mitochondrií, Buhayová (2009) doporučuje žábry. Vzhledem k tomu, že součástí této studie byla snaha o co nejmenší poškození raka kamenáče, byl pro analýzu odebírán pereopod. Ovšem pereopod obsahuje hlavně svalovou tkáň, která také obsahuje velké množství mitochondrií, takže je nepravděpodobné, že by osekvenování pseudogenu souviselo s nedostatkem

mitochondriální DNA v izolátu.

Není snad ani třeba psát, že záměna jaderného pseudogenu za mitochondriální gen může vést k chybným výsledkům fylogenetických a fylogeografických studií. Příkladem může být fylogenetická studie, jejíž autoři se setkali s velkým počtem pseudogenů u čtvrtiny z 28 příbuzných druhů krevet. Sekvence pseudogenů mitochondriálního genu COI a 12S zahrnuté do fylogenetické analýzy utvořily skupinu bez ohledu na vztahy odvozené podle funkčních mitochondriálních genů (Baeza a Fuentes 2013).

U sekvencí získaných pomocí primerů COI-F a Scylla a extrakcí z gelu bylo rovněž potvrzeno, že nejde o sekvence genu COI. Ani u jednoho ze dvou získaných fragmentů se nepodařilo určit zda jde o pseudogeny. Malá podobnost těchto sekvencí je vidět i na míře jejich odlišnosti od sekvence haplotypu ht1 (viz výsledky), ke kterému všechny použité vzorky patřily. Lze předpokládat, že kdyby byl dlouhý fragment, který je sekvencí COI podobnější pseudogenem byl by podobný přinejmenším některým mitochondriálním sekvencím nahaným v GenBank. Shodu s mitochondriálními sekvencemi jiných organismů se podařilo najít jen ve dvou krátkých úsecích sekvence (viz výsledky) a jinak se tento úsek nepodobal žádné sekvenci z GenBank. Je možné, že při extrakci z gelu se nepodařilo zcela oddělit oba fragmenty, což následně vedlo ke špatné sekvenaci. Nejpravděpodobnější důvod neúspěchu použití reverzního primeru Scylla je ten, že tento primer u raka kamenáče přisedá na jinou část genomu, než je sekvence genu COI. Amplifikace dvou fragmentů a následný neúspěch při jejich sekvenaci po gelové extrakci popsali i Baeza a Fuentes (2013).

Z několika porovnávaných prací zabývajících se genetickou variabilitou COI genu u desetinoch koryšů (Teske a kol. 2007) a zejména u raků rodu *Austropotamobius* (Braband a kol. 2006, Pedraza-Lara a kol. 2010, Matallanas a kol. 2011) se nepodařilo najít další kombinaci primerů, která by umožnila osekvenování genu COI na délce blízké se 1100 bp, které jsem původně měl v plánu osekvenovat. Některé kombinace primerů by potenciálně mohly vést ke zvýšení délky krátkého úseku DNA, například amplifikace primerem COI-F a DecapodCOI-R (Teske a kol. 2007) by vedla k prodloužení úseku genu COI o 57 bp.

Moje studie se zaměřila na osekvenování jednoho dlouhého úseku genu COI pomocí známých primerů a tento postup bohužel neuspěl. Alternativou vedoucí ke stejnému výsledku (tj. získání prodlouženého úseku genu COI) by mohlo být osekvenování více kratších překrývajících se úseků genu COI. Takový postup byl u genu COI použit v práci studující genetickou variabilitu u raka bělonohého (Pedraza-Lara a kol. 2010). Autoři této studie získali úsek genu COI dlouhý 657 bp složením dvou překrývajících se úseků genu COI. První z těchto úseků byl získán pomocí primerů ORCO1F (Taylor a Hardman 2002)

a ApaCOI1H (Pedraza-Lara a kol. 2010), druhý úsek byl získán pomocí primerů C1-J-2183 (Simon a kol. 1994) a Scylla. Nicméně takto získaný úsek přibližně odpovídá úseku získanému pomocí primerů CoxFOR a CoxREV (Braband a kol. 2006), který se se standardním úsekem genu COI nepřekrývá a tudíž by se nedal použít pro porovnání s běžným krátkým úsekem genu COI. Použití dvou dvojic primerů by bylo časově a finančně náročnější a je zde tudíž uvedeno spíše jen jako teoretická možnost.

Kromě snahy o prodloužení krátkého úseku genu COI lze získat více variabilní data použitím jiného markeru. Mitochondriální gen COI, který jsem použil ve své studii je nejpoužívanějším genem ke studiu genetické variability a barcodingu (Hebert a kol. 2003). Další mitochondriální geny často používané u desetinohých korýšů jsou geny 12S a 16S. Tyto dva geny jsou například u krevet méně variabilní než gen COI (Baeza a Funtres 2013). Sekvence genů 12S a 16S tedy nejsou pravděpodobně vhodnými alternativami. U populací raka kamenáče na sever od Alp došlo ke snížení variability mitochondriální DNA. Mitochondriální DNA je obecně náchylnější ke ztrátě variability v důsledku zmenšení velikosti populací z toho důvodu, že se obvykle dědí jen v maternální linii a má tudíž menší efektivní velikost populace než jaderná DNA. Jaderná DNA si zachovává větší míru variabilitu i u populací, které prošly poklesem početnosti v minulosti. Gouin a kol. (2006) úspěšně popsali scénář postupného šíření raka bělonohého v Irsku pomocí metody RAPD používající jadernou DNA, zatímco metoda RFLP u stejných populací odhalila pouze jeden haplotyp. Podobně byla zjištěna vyšší variabilita alozymových lokusů u českých populací invazního raka pruhovaného (Filipová a kol. 2009) než byla zjištěna pomocí genu COI (Filipová a kol. 2011). Snížení mitochondriální variability u raka pruhovaného bylo způsobeno jedinou introdukcí několika desítek jedinců do Evropy (Filipová a kol. 2011). Lze tedy předpokládat, že pro studium genetické diverzity a případně i populační diverzity raka kamenáče v povodí Labe by byly nejvhodnější jaderné markery. V současnosti jsou nejpoužívanějšími jadernými markery mikrosatelity. Mikrosatelity již byly pro raka kamenáče navrženy (Iorgu a kol. 2011). Další alternativou jsou některé z řady takzvaných metod sekvenování příští generace (NGS), které umožňují například oskenovat celý genom (Mardis 2008).

6 Závěr

Na základě zjištěných informací o genetické diverzitě raka kamenáče v povodí Labe a dalších částech střední Evropy se podařilo podpořit předpoklad přirozeného původu většiny populací raka kamenáče v povodí Labe. Dále byl navržen nejpravděpodobnější historický scénář kolonizace povodí Labe na konci poslední doby ledové překonáním rozvodí mezi povodím Dunaje a Labe v oblasti Českého lesa. Rozhodujícím pro tyto závěry je rozložení haplotypové diverzity ve střední Evropě a stávající znalosti o výskytu raka

kamenáče v povodí Labe. Pouze u populace z Lučního potoka z Podkrkonoší je nejpravděpodobnějším scénářem jejího původu introdukce ze středního Slovinska.

Výsledkem pokusu o sekvenaci dlouhého úseku genu COI pomocí standardního barcodingového primeru COI-F a reverzních primeru CoxREV nebo Scylla vedly k získání sekvencí, které nejsou sekvencemi genu COI. Primery CoxREV a Scylla přisedají u raka kamenáče na jinou část genomu, a pro zjišťování genetické diverzity u tohoto druhu jsou tedy nevhodné. Zkušenosti získané v mé práci potvrzují riziko sekvenace jaderných pseudogenů nebo jiných částí genomu při snaze osekvenovat široce používaný mitochondriální gen pro COI i při použití primerů úspěšně použitých v jedno případě u raka kamenáče (CoxREV) a u příbuzného raka bělonohého (Scylla). Zároveň jsem si ověřil, že pečlivá kontrola by měla zabránit záměně pseudogenu a mitochondriálního genu.

Z dalších alternativ pro získání rozšířeného souboru dat se zdají být nejvhodnějšími jaderné markery. Jaderné markery jsou obecně variabilnější u populací, které prošly výrazným snížením početnosti. Detailnější představu o původu a historii populací raka kamenáče je pravděpodobně možné získat pomocí jaderných markerů, mikrosatelitů, které by měly být u populací raka kamenáče na sever od Alp, variabilnější než mnou studovaný mitochondriální gen.

7 Seznam citované literatury:

- Agerberg A.** (1990). Genetic variation in the three species of freshwater crayfish, *Astacus astacus* L., *Astacus leptodactylus* Aesch., and *Pacifastacus leniusculus* (Dana), revealed by isozyme electrophoresis. *Hereditas* 113: 101-108.
- Aldridge D.** (2011) GB Non-natives Factsheet Editor: *Astacus astacus* (cit. 10. 8. 2013). Dostupné z http://www.brc.ac.uk/gbnn_admin/index.php?q=node/337.
- Almeida D., Ellis A., England J. a Copp H. G.** (v tisku). Time-series analysis of native and non-native crayfish dynamics in the Thames river basin (south-eastern England). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. a Lipman D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Avise J. C.** (2013). History and Conceptual Background. In: **Avise J. C.:** *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, str. 1-109.
- Baeza J. A. a Fuentes M. S.** (2013). Exploring phylogenetic informativeness and nuclear copies of mitochondrial DNA (numts) in three commonly used mitochondrial genes: mitochondrial phylogeny of peppermint, cleaner, and semi-terrestrial shrimps (Caridea: *Lysmata*, *Exhippolysmata*, and *Merguia*). *Zoological Journal of the Linnean Society* 168: 699-722.
- Baric S., Höllrigl A., Füreder L., Petutschnig J. a Dalla Via J.** (2006). First analysis of genetic variability in carinthian populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 380-381: 977-980.
- Bermingham E. a Moritz C.** (1998). Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Biology* 7: 4: 367-369.
- Bernatchez L. a Wilson C. C.** (1998). Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7: 431-452.
- Beroiz B., Callejas C., Alonso F. a Ochando M. D.** (2008). Genetic structure of Spanish whiteclawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) populations as determined by RAPD analysis: reasons for

- optimism. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18: 190-201.
- Braband A., Kawai T. a Scholtz G.** (2006). The phylogenetic position of the East Asian freshwater crayfish *Cambaroides* within the Northern Hemisphere Astacoidea (Crustacea, Decapoda, Astacida) based on molecular data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44(1): 17-24.
- Bubb D. H., Thom T. J. a Lucas M. C.** (2005). The within-catchment invasion of the non-indigenous signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) in upland rivers. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 376-377: 665-673.
- Bubb D. H., Thom T. J. a Lucas M. C.** (2008). Spatial ecology of the white-clawed crayfish in an upland stream and implications for the conservation of this endangered species. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18: 647-657.
- Buhay J. E.** (2009). „COI-like“ Sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology* 29(1): 96-110.
- Cataudella R., Paolucci M., Delaunay C., Ropiquet A., Hassanin A., Balsamo M., a Grandjean F.** (2010). Genetic variability of *Austropotamobius italicus* in the Marches region: Implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 20: 261-268.
- Claussen D. L., Hopper R. A. a Sanker A. M.** (2000). The effects of temperature, body size, and hydration state on the terrestrial locomotion of the crayfish *Orconectes rusticus*. *Journal of Crustacean Biology* 20(2): 218-223.
- Crandall K. A. a Buhay J. E.** (2008). Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae and Parastacidae-Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 295-301.
- Crandall K. A., Harris D. J. a Fetzner W. Jr** (2000). The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society of London* 267: 1679-1686.
- Charlebois P. M., a Lamberti G. A.** (1996). Invading crayfish in a Michigan stream: direct and indirect effects on periphyton and macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society* 15: 551-563.
- Chiesa S., Scalici M., Negrini R., Gibertini G. a Marzano F. N.** (2011). Fine-scale genetic structure, phylogeny and systematics of threatened crayfish species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 1-11.
- Chlupáč I** (2002). Geologická minulost České republiky. Praha: Academia. 436 str.
- Diéguez-Urbeondo J., Royo F., Souty-Grosset C., Ropiquet A. a Grandjean F.** (2008). Low genetic variability of the white-clawed crayfish in the Iberian Peninsula: its origin and managements implications. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18: 19-31.
- Dunn J. C., McClymont H. E., Christmas M. a Dunn A. M.** (2009). Competition and parasitism in native white clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* and the invasive signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in the UK. *Biological Invasions* 11: 2: 315-324.
- Dušek J., Ďuriš Z., Fischer D., Petrusek A., Štambergová M. a Vlach P.** (2009). Metodika monitoringu raka kamenáče včetně příloh (2006 upraveno). V knize: Štambergová M., Svobodová J. a Kozubíková E., Raci v České republice. AOPK, Praha, 217-227.
- Ďuriš Z., Horká I., Buřič M. a Kozák P.** (2013). Ekologie raků. In: **Kozák P.** (ed.): Biologie a chov raků, *Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. Fakulta rybářství a ochrany vod*, Vodňany, 225-237.
- Ďuriš Z., Horká I. a Kozák P.** (2013). Morfologie a anatomie raků. In: **Kozák P.** (ed.): Biologie a chov raků, *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Fakulta rybářství a ochrany vod*, Vodňany, 153-184.
- Edsman L., Farris J. S., Källersjö M. a Prestegard T.** (2002). Genetic differentiation between noble crayfish, *Astacus astacus* (L.) populations detected by microsatellite length variation in the rDNA ITS1 region. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 367: 691-706.
- Englbrecht C. C., Freyhof J., Nolte A., Rassmann K., Schlieven U. a Tautz D.** (2000). Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations. *Molecular Ecology* 9: 709-722.
- Ergei B., Hably L., Kázmér M., Utescher T., Bruch A. A.** (2007). Neogene flora and vegetation development of the pannonian domain in relation to palaeoclimate and palaeogeography. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 253: 115-140

- Filipová L., Kozubíková E. a Petrusek A.** (2009). Allozyme variation in Czech populations of the invasive spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* (Cambaridae). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 394-395: 10.
- Filipová L., Holdich D. M., Lesobre J., Grandjean F. a Petrusek A.** (2010). Cryptic diversity within invasive virile crayfish *Orconectes virilis* (Hagen, 1870) species complex: new lineages recorded in both native and introduced ranges. *Biologic Invasions* 12: 983-989.
- Filipová L., Lieb D. A., Grandjean F. a Petrusek A.** (2011). Haplotype variation in the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus*: colonization of Europe and genetic diversity of native stock. *Journal of the North American Benthological Society* 30(4): 871-881.
- Fischer D., Bádr V., Vlach P. a Fischerová J.** (2004). Nové poznatky o rozšíření raka kamenáče v Čechách. *Živa* 52: 79-81.
- Fischer D., Pavlůvčík P., Sedláček F. a Šálek M.** (2009). Predation of the alien American mink, *Mustela vison* on native crayfish in middle-sized streams in central and western Bohemia. *Folia Zoologica* 58: 1: 45-56.
- Folmer O. M., Black M., Hoeh R., Lutz R. A Vrijenhoek R.** (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 304-313.
- Forster P., Torroni A., Renfrew C. a Röhl A.** (2001)- Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1864-1881.
- Fratini S., Zaccara S., Barbese S., Grandjean F., Souty-Grosset C., Crosa G. a Gherardi F.** (2005). Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. *Heredity* 94: 108-118.
- Freeman M. A., Turnbull J. F., Yeomans W. E. a Bean C. W.** (2009). Prospects for management strategies of invasive crayfish populations with emphasis on biological control. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* 20(2): 211-223.
- Frey J. E., a Frey B.** (2004). Origin of intra variation in PCR-amplified mitochondrial cytochrome oxidase I of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae): mitochondrial heteroplasmy or nuclear integration. *Heredity* 140: 92-98.
- Frisch D., Green A. J. a Figuerola J.** (2007). High dispersal capacity of a broad spectrum of aquatic invertebrates via waterbirds. *Aquatic Science* 69: 568-574.
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S. a Hurst G. D. D.** (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541-4550.
- Gherardi F.** (2010). Invasive crayfish and freshwater fishes of the world. *Revue Scientifique et Technique-office interantional des Epizooties* 29: 2: 241-254.
- Gopurenko D., Hughes J. M. a Keenan C. P.** (1999). Mitochondrial DNA evidence for rapid colonisation of the Indo-West Pacific by the mudcrab *Scylla Serrata*. *Marine Biology* 134, 227-233.
- Gouin N., Grandjean F. a Souty-Grosset C.** (2006). Population genetic structure of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in France based on microsatellite variation: biogeographical inferences and conservation implications. *Freshwater Biology* 51: 1369-1387.
- Gouin N., Grandjean F., Pain S., Souty-Grosset C. a Reynolds J.** (2003). Origin and colonization history of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*, in Ireland. *Heredity* 91: 70-77.
- Grandjean F., Frelon-Raimond M. a Souty-Grosset C.** (2002). Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: One species or several? *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 367: 671-680.
- Grandjean F., Gouin N., Souty-Grosset C. a Diéguez-Urbeondo J.** (2001). Drastic bottlenecks in the endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* in Spain and implications for its colonization history. *Heredity* 86: 431-438.
- Grandjean F., Harris D. J., Souty-Grosset C. a Crandall K. A.** (2000). Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* 20: 522-529.
- Grandjean F. a Souty-Grosset C.** (2000). Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. *Conservation genetics* 1: 309-319.
- Grandjean F., Souty-Grosset C. a Holdich D. M.** (1997b). Mitochondrial DNA variation in four British

- populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*: implications for management. *Aquatic Living Resources* 10: 121-126.
- Grandjean F., Souty-Grosset C., Raimond R. a Holdich D. M.** (1997a). Geographical variation of mitochondrial DNA between populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Freshwater Biology* 37: 493-501.
- Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin R. C. a Gelbart W. M.** (2000). Molecular Biology of Gene Function: Genetic code: Stop codons. In: **Freeman H.** (ed.): An introduction to genetic Analysis. W. H. Freeman and company.
- Grote J. R.** (1981). The effect of load on locomotion in crayfish. *Journal of Experimental Biology* 92: 277-288.
- Haggerty S. M., Batzer D. P. a Jackson C. R.** (2002)- Macroinvertebrate assemblages in perennial headwater streams of the Coastal Mountain range of Washington, U.S.A. *Hydrobiologia* 479: 143-154.
- Hänfling B., Hellemans B., Volckaert F. A. M. a Carvalho G. R.** (2002). Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 11: 1717-1729.
- Hantke R.** (1993) Flußgeschichte Mitteleuropas. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. **Sekundární citace**
- Hasegawa M., Kishino H., a Yano T.** (1985). „Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA“. *Journal of Molecular Evolution* 22(2): 160-174.
- Hazkani-Covo E. a Graur G.** (2007). A comparative analysis of numt evolution in human and chimpanzee. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1: 13-18.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., a deWaard J. R.** (2003). Biological identifications trough DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- Hewitt G. M.** (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J. D., Higgins D. G. a Gibson T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment trough sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- Holdich D. M.** (2002a). Background and Functional Morphology. In: Holdich D. M. (ed.): Biology of freshwater crayfish. *Blackwell Science Ltd*, London, 3-27.
- Holdich D. M.** (2002b). Distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 367: 611-650.
- Holdich D. M., Haffner P., Noël P., Carral J., Füreder L., Gherardi F., Machino Y., Madec J., Pöckl M., Śmietana P., Taugbol T. a Vigneux E.** (2006). Species files. In: Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noël P. Y., Reynolds J. D., Haffner P. (eds), *Atlas of Crayfish in Europe*. Muséum National d' Histoire naturelle, Paris, pp. 49-130.
- Holdich D. M., Palmer M. a Sibley P. J.** (2009a). The indigenous status of *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) in Britain. In: Brickland J., Holdich D. M., Imhoff E. M. (Eds.): Crayfish conservation in the British Isles. Proceedings of a conference held on 25th March 2009 in Leeds, UK.
- Holdich D. M., Reynolds J. D. a Souty-Grosset C.** (2009b). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 394-395: 11.
- Holdich D. M. a Reeve I. D.** (1991). The distribution of freshwater crayfish in the British Isles with particular references to crayfish plague, alien introduction and water quality. *Aquatic Conseravation* 1(2): 139-158.
- IUCN** (2013). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <www.iucnredlist.org> (2.8. 2013).
- Innis M. A. a Gelfand D. H.** (1990). Optimalization of PCRs. V: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J.).
- Iorgu E. I., Popa O. P., Petrescu A.-M. a Popa L. O.** (2011). Cross-amplification of microsatellite loci in the endangered stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Decapoda). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401, 08.
- Kadlecová K., Bílý M. a Maciak M.** (2012). Movement patterns of the co-occurring species *Astacus astacus* (noble crayfish) and *Austropotamobius torrentium* (stone crayfish). *Fundam, Appl. Limnol.*

- Klobučar G. I. V., Podnar M., Jelić M., Franjević D., Faller M., Štambuk A., Gottstein S., Simić V. a Maguire I.** (2013). Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. *Freshwater Biology* 58: 6: 1089-1105.
- Kõiv K., Gross R., Paaver T. a Kuehn R.** (2008). Isolation and characterization of first microsatellite markers for the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Conservation Genetics* 9: 1703-1706.
- Kouba A., Buřič M. a Petrusek A.** (2013). Druhy raků v Evropě. In: **Kozák P.** (ed.) Biologie a chov raků. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany*, 75-152.
- Koutrakis E. T., Machino Y., Kallianiotis A. a Holdich D. M.** (2005). *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) in the Aggitis cave (Northern Greece). Is it a cave-dwelling species. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 376-377: 529-538.
- Kozák P., Ďuriš Z. a Policar T.** (2002). The stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank) in the Czech Republic. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 367: 707-713.
- Kozubíková E., Filipová L., Kozák P., Ďuriš Z., Martín M. P., Diéguez-Urbeondo J., Oidtmann B. a Petrusek A.** (2009). Prevalence of the Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American Crayfishes in the Czech Republic. *Conservation Biology* 23: 5: 1204-1213.
- Kozubíková E., Petrusek A., Ďuriš Z., Kozák P., Geiger S., Hoffman R. a Oidtmann B.** (2006). the crayfish plague in the Czech Republic – Review of recent suspect cases and a pilot detection study. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 380-381: 1313-1323.
- Largiadèr C. R., Herger F., Lörtscher M. a Scholl A.** (2000). Assessment of natural and artificial propagation of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* species komplex) in the Alpine region with nuclear and mitochondrial markers. *Molecular Ecology* 9: 25-37.
- Lodge D. M. a Lorman J. G.** (1987). Reductions in submersed macrophyte biomass and species richness by the crayfish *Orconectes rusticus*. *Can J. Fish. Aquat. S.* 44: 591-597.
- Machino Y. a Füreder L.** (1998). Der Steinkrebs *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) im Haldensee (Tirol, Österreich) und weitere Nachweise von Flußkrebsen in hochgelegenen Gewässern. *Ber. Nat.-med. Verein Innsbruck* 85: 223-229.
- Machino Y. a Füreder L.** (2005). How to find a stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) a biogeographic study in Europe. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 376-377: 507-517.
- Machino Y. a Holdich D. M.** (2006). Distribution of crayfish in Europe and Adjacent Countries: Updates and Comments. *Freshwater crayfish* 15: 292-323.
- Maguire I. a Gottstein-Matočec S.** (2004). The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. *Crustaceana* 77(1): 25-47.
- Mardis E. R.** (2008). Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 387-402.
- Martin P., Dorn N. J., Kawai T., van der Heiden C. a Scholtz G.** (2010). The enigmatic Marmorkrebs (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870). *Contribution to Zoology* 79(3): 107-118.
- Martin P., Pfeifer M., a Füllner** (2008). First record of the stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) from Saxony (Germany). *Faunistische Abhandlungen (Dresden)* 26: 103-108.
- Matallanas B., Ochando M. D., Vivero A., Beroiz B., Alonso F. a Callejas C.** (2011). Mitochondrial DNA variability in Spanish populations of *A. italicus* from the analysis of a COI region. *Knowledge and management of Aquatic Ecosystems* 401: 30.
- Moritz C.** (1994). Defining Evolutionary Significant Units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 10: 373-375.
- Nobel A.** (2000). Chelex® 100 a Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual. *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA* 94547.
- Palmer M. A., Allan J. D. a Butman C. A.** (1996). Dispersal as a regional process affecting the local dynamics of marine and stream benthic invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 8: 322-326.
- Pârvulescu L.** (2012). The distribution and ecological preferences of stone crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) (Decapoda: Astacidae) in the northwestern Romania. *Travaux du Muséum*

- Pârvulescu L., Pacioglu O. a Hamchevici C.** (2011). The assessment of the habitat and water quality requirements of the stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) species in the rivers from the Anina Mountains (SW Romania). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401: 03.
- Pârvulescu L., Zaharia C., Satmari A. a Drăgut L.** (v tisku). Is the distribution pattern of stone crayfish in the Carpatians related to karstic refugia from Pleistocene glaciations?
- Pedraza-Lara C., Alda F., Carranza S. a Doadrio I.** (2010). Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 327-342.
- Pešek P.** (2011). Fylogeografie a genetická variabilita bentických korýšů v evropských vnitrozemských vodách. Bakalářská práce.
- Petrusek A.** (2013). Genetika raků. In: **Kozák P** (ed.): Biologie a chov raků. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany*, 59-75.
- Pöckl M. a Streissl F.** (2005). *Austropotamobius torrentium* as an indicator for habitat quality in running waters? *Bull. Fr. Peche Piscic.* 376-377: 734-758.
- Previšić A., Walton C., Kučinić M., Mitrikeski P. T. a Kerovec M.** (2009). Pleistocene divergence of Dinaric *Drusus* endemics (Trichoptera, *Limnephilidae*) in multiple microrefugia within the Balkan Peninsula. *Molecular Ecology* 18: 634-647.
- Provan J. a Bennett K. D.** (2008). Phylogeographic insights into cryptic refugia. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 564-571.
- Rögl V. F.** (1998). Paleogeographic Considerations for Mediterranean and Paratethys Seaways (Oligocene to Miocene). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 99 A: 279-310.
- Santucci F., Iaconelli M., Andreani P., Cianchi R., Nascetti G. a Bullini L.** (1997). Allozyme diversity of european freshwater crayfish of genus *Austropotamobius*. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 347: 663-676.
- Schrimpf A., Schulz H. K., Theissinger K., Pârvulescu L. a Schulz R.** (2011). The first large-scale genetic analysis of the vulnerable noble crayfish *Astacus astacus* reveals low haplotype diversity in central European populations. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401: Article number: 35.
- Schubart C. D. a Huber M. G. J.** (2006). Genetic comparisons of German populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidea). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 380-381: 1019-1028.
- Siegismund H. R. a Müller J.** (1991). Genetic structure of *Gammarus fossarum* populations. *Heredity* 66: 419-436.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. a Flook P.** (1994). Evolution weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651-701.
- Sinclair E. A., Fetzner J. W., Buhay J. a Crandall K.A.** (2004). Proposal to complete a phylogenetic taxonomy and systematic revision for freshwater crayfish. *Freshwater Crayfish* 14: 21-29.
- Söderhäll K., a Cerenius L.** (1999). the crayfish plague fungus: Historia and recent advances. *Freshwater Crayfish* 12: 11-35.
- Souty-Grosset C., Kozák P. a Reynolds J.** (2011). Hosting European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC), key role of crayfish in ecosystems and socioeconomic relevance European crayfish: food, flagships and ecosystems services 26-29 October, Poitiers, France. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401: 32.
- Statzner B., Opeltret O. a Tomanova S.** (2003). Crayfish as geomorphic agents and ecosystems engineers: effect of a biomass gradient on baseflow and flood-induced transport of gravel and sand in experimental streams. *Freshwater Biology* 48: 147-163.
- Stefani F., Zaccara S., Delmastro G. B., a Buscarino M.** (2011). The endangered white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (Decapoda, Astacidea) east and west of the Maritime Alps: a result of human translocation? *Conservation Genetics* 12: 51-60.
- Stloukal E. a Harvénková M.** (2005). Distribution of *Austropotamobius torrentium* (Decapoda: Astacidae) in Slovakia. *Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture* 367-377: 547-552.
- Strayer D. L.** (2010). Alien species in fresh waters: ecological effects, interactions with other stressors,

- and prospects for the future. *Freshwater Biology* 55: 152-174.
- Svobodová J., Štambergová M., Vlach P., Pícek J., Douda K. a Beránková M.** (2008). Vliv jakosti vody na populace v České republice – porovnání s legislativou ČR. *Vodní hospodářství: Vodohospodářské technicko-ekonomické informace* 50: 6: 1-4.
- Štambergová M., Bádr V. a Ďuriš Z.** (2005). **Decapoda (desetinožci).** In: **Farkač J., Král D. A Škorpík M.** (eds.). Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí. List of threatened species in the Czech Republic. Invertebrates. – *Agentura ochrany přírody a krajiny ČR*, Praha 100-101.
- Štambergová M., Svobodová J. a Kozubíková E.** (2009). Raci v české republice. Praha.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.-G. a Cosson J.-F.** (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. a Kumar S.** (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Taylor C. A., a Hardman M.** (2002). Phylogenetics of the crayfish subgenus *Crockerinus*, genus *Orconectes* (Decapoda: *Cambaridae*). Based on cytochrome oxidase I. *Journal of Crustacean Biology* 22: 874-881.
- Teske P. R., Papadoulos I., Zardi G. I., McQuaid C. D., Edkins M. T., Griffiths C. L. a Barker N. P.** (2007). Implications of life history for genetic structure and migration rates of southern African coastal invertebrates: planktonic, abbreviated and direct development. *Marine Biology* 152: 697-711.
- Tomlinson M. L. a Perrow M. R.** (2003), Ecology of the Bullhead. Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series No.4. English Nature, Peterborough.
- Trontelj P., Machino Y. a Sket B.** (2005). Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 212-226.
- Trouilhé M.-C., Souty-Grosset C., Grandjean F. a Parinet B.** (2007). Physical and chemical water requirements of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in western France. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 17: 5: 520-538.
- Vainio J. K. a Väinölä R.** (2003). Refugial races and postglacial colonization history of the freshwater amphipod *G. lacustris* in northern Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 523-542.
- Vanschoenwinkel B., Waterkeyn A., Vandecaetsbeek T., Pineau O., Grillas P. a Brendock L.** (2008). Dispersal of freshwater invertebrates by large terrestrial mammals: a case study with wild boar (*Sus scrofa*) in Mediterranean wetlands. *Freshwater Biology* 53: 2264-2273.
- Verovnik R., Sket B., Prevorčnik S. a Trontelj P.** (2003). Random amplified polymorphic DNA diversity among surface and subterranean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: isopoda). *Genetica* 119: 155-165.
- Verovnik R., Sket B. a Trontelj P.** (2004). Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology* 13: 1519- 532.
- Verovnik R., Sket B. a Trontelj P.** (2005). The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular Ecology* 14: 4355-4369.
- Vlach P., Hulec L. a Fischer D.** (2009). Recent distribution, population densities and ecological requirements of the stone crayfish (*austropotamobius torrentium*) in the Czech Republic. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 394-395: 13.
- Vlach P., Svobodová J. a Fischer D.** (2012). Stone crayfish in the Czech Republic: how does its population density depend on basic chemical and physical properties of water? *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 407: article number 05.
- Vorburger C. a Ribí G.** (1999). Aggression and competition for shelter between a native and introduced crayfish in Europe. *Freshwater Biology* 42: 111-119.
- Weinländer M. a Füreder L.** (2011). Crayfish as trophic agents: Effect of *Austropotamobius torrentium* on zoobenthos structure and function in small forest stream. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401: 22.
- Zaccara S., Stefani F. a Crosa G.** (2005). Diversity of mitochondrial DNA of the endangered white-clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) in the Po river catchment. *Freshwater Biology* 50:

1262-1272.

Zhang Y., Richardson J. S. a Negishi J. N. (2004). Detritus processing, ecosystem engineering and benthic diversity: a test of predator-omnivor interference. *Journal of Animal Ecology* 73: 756-766.